

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica



**BIOACTIVIDAD Y BIOCMPATIBILIDAD DE
MATERIALES SOL-GEN CON CONTENIDO CONSTANTE
EN CaO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Isabel Martín Barral

Bajo la dirección de los doctores

María Vallet Regí

Antonio Jesús Salinas Sánchez

Madrid, 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica



**BIOACTIVIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD
DE MATERIALES SOL-GEL
CON CONTENIDO CONSTANTE EN CaO**

ANA ISABEL MARTÍN BARRAL

Madrid 2005

ANA ISABEL MARTÍN BARRAL

**BIOACTIVIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES
SOL-GEL CON CONTENIDO CONSTANTE EN CaO**

MEMORIA

**Para optar al grado de
DOCTORA POR LA UCM**

Directores:

María Vallet Regí

Catedrática de Química Inorgánica

Antonio Jesús Salinas Sánchez

Profesor Titular de Química Inorgánica

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica

Madrid 2005

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se ha realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid a cuya directora, la Profesora *María Vallet Regí*, quiero agradecer la oportunidad de realizar esta tesis y de trabajar en el Departamento.

A mis directores de tesis, los Dres. *María Vallet Regí* y *Antonio Jesús Salinas Sánchez* por dedicarme su tiempo y esfuerzo y por todo lo que he aprendido de ellos profesional y humanamente hablando.

A los Dres. *María Antonia Lizarbe*, *Nieves Olmo* y *Javier Turnay* del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la U. C. M., donde se llevaron a cabo los estudios de cultivos celulares.

A los Dres. *Rui Correia*, *Paula Marques*, y *Clara Magalhães* del Departamento de Ingeniería Cerámica y de Vidrio de la Universidad de Aveiro (Portugal) por su valiosa colaboración en el estudio de los materiales en Plasma Inorgánico Simulado Carbonatado.

Asimismo, me gustaría agradecer al Dr. *Joaquín Pérez Pariente* su inestimable ayuda en la discusión de las propiedades texturales de los materiales, al Dr. *Fernando Conde López* del C. A. I. de difracción de rayos-X de la U. C. M. y a D. *Alfonso Rodríguez* del C. A. I. de microscopía electrónica de la U. C. M. por su valiosa asistencia técnica y profesional.

Agradecimientos

A todos mis compañeros del Departamento, por su compañerismo y, en definitiva, buen ambiente que han contribuido a hacer el trabajo más agradable.

A mis padres, por su cariño y todo lo que tan desinteresadamente hacen por mí. A David, por su amor e interés con el que ha seguido esta investigación. A Dña. Teresa, por su ayuda y amistad. A mis amigos, por los buenos momentos compartidos.

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo económico del C.I.C.Y.T. a través de los proyectos: MAT99-0466 y MAT2002-0025 cuya investigadora principal es la Dra. María Vallet Regí y MAT2001-1445-C02-01 cuyo investigador principal es el Dr. Antonio Jesús Salinas Sánchez.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.1. Materiales para sustitución de tejido conectivo: Situación actual y perspectivas de futuro.....	4
<i>I.1.1. Biomateriales basados en Ingeniería de Materiales.....</i>	<i>4</i>
<i>I.1.2. Dispositivos diseñados para interactuar con el organismo: Ingeniería de Tejidos.....</i>	<i>5</i>
I.2. Vidrios bioactivos.....	11
<i>I.2.1. Estructura de los vidrios.....</i>	<i>11</i>
<i>I.2.2. Vidrios sol-gel bioactivos.....</i>	<i>13</i>
I.3. Bioactividad <i>in vivo</i> frente al comportamiento <i>in vitro</i>.....	15
<i>I.3.1. Influencia de la composición y textura en la bioactividad <i>in vitro</i>....</i>	<i>16</i>
<i>I.3.2. Nuevos protocolos <i>in vitro</i>.....</i>	<i>18</i>
I.4. Biocompatibilidad de vidrios sol-gel.....	20
<i>I.4.1. Cultivos celulares.....</i>	<i>20</i>
<i>I.4.2. Estudios <i>in vivo</i> en animales de experimentación.....</i>	<i>22</i>
I.5. Aspectos de los vidrios sol-gel bioactivos inéditos al inicio de este trabajo.....	24
I.6. Objetivos.....	29
II. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE VIDRIOS SOL-GEL CON 25% EN MOLES DE CaO.....	31
II.1. Síntesis de los vidrios.....	32
II.2. Caracterización de los vidrios.....	34
<i>II.2.1. Análisis termogravimétrico de los xerogeles (ATG).....</i>	<i>34</i>
<i>II.2.2. Fluorescencia de rayos X (FRX).....</i>	<i>35</i>
<i>II.2.3. Difracción de rayos X (DRX).....</i>	<i>35</i>
<i>II.2.4. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF).....</i>	<i>36</i>

II.2.5. Microscopia electrónica de barrido y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (MEB-EDX).....	37
II.2.6. Porosimetría de intrusión de Hg.....	37
II.2.7. Adsorción de N ₂	39
II.3. Efecto del P₂O₅ en los vidrios.....	40
II.3.1. Formación de núcleos cristalinos de fosfato de calcio.....	40
II.3.2. Variación de la superficie específica y porosidad.....	41
III. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE VIDRIOS SOL-GEL.....	44
III.1. Bioactividad.....	45
III.1.1. SBF estático.....	45
III.1.1.a. Protocolo SBF estático.....	45
III.1.1.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución.....	46
III.1.1.c. Estudio de la superficie de los vidrios.....	48
III.1.1.c.1. DRX.....	48
III.1.1.c.2. IRTF.....	49
III.1.1.c.3. MEB-EDX.....	52
III.1.1.d. Comportamiento de los vidrios en SBF estático: Efecto del P ₂ O ₅	55
III.1.2. SBF dinámico.....	57
III.1.2.a. Protocolo SBF dinámico.....	57
III.1.2.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución.....	58
III.1.2.c. Estudio de la superficie de los vidrios.....	59
III.1.2.c.1. DRX.....	59
III.1.2.c.2. IRTF.....	60
III.1.2.c.3. MEB-EDX.....	62
III.1.2.d. Comportamiento de los vidrios en SBF dinámico.....	64
III.1.3. Plasma Inorgánico Simulado Carbonatado (CSIP).....	67
III.1.3.a. Protocolo CSIP.....	67

<i>III.1.3.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución.....</i>	68
<i>III.1.3.c. Estudio de la superficie del vidrio S72.5P2.5.....</i>	68
<i>III.1.3.c.1. DRX.....</i>	69
<i>III.1.3.c.2. IRTF.....</i>	69
<i>III.1.3.c.3. MEB-EDX.....</i>	70
<i>III.1.3.d. Comportamiento de S72.5P2.5 en CSIP.....</i>	73
<i>III.1.4. SBF enriquecido con albúmina (SBF + alb).....</i>	74
<i>III.1.4.a. Protocolo SBF + alb.....</i>	74
<i>III.1.4.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución.....</i>	74
<i>III.1.4.c. Estudio de la superficie de los vidrios.....</i>	74
<i>III.1.4.c.1. IRTF.....</i>	75
<i>III.1.4.c.2. MEB-EDX.....</i>	75
<i>III.1.4.d. Cinética de adsorción de albúmina.....</i>	76
<i>III.1.4.e. Comportamiento de los vidrios en SBF + alb.....</i>	77
III.2. Biocompatibilidad.....	78
<i>III.2.1. Protocolo de los cultivos celulares de osteoblastos.....</i>	78
<i>III.2.1.a. Cinética de adhesión celular.....</i>	80
<i>III.2.1.b. Preparación de las muestras para MEB.....</i>	81
<i>III.2.1.c. Incorporación de metil-[³H] timidina.....</i>	81
<i>III.2.1.d. Actividad de la fosfatasa alcalina.....</i>	82
<i>III.2.2. Adhesión celular a los vidrios.....</i>	82
<i>III.2.3. Extensión sobre los vidrios.....</i>	86
<i>III.2.4. Extensión sobre los vidrios recubiertos de CHA.....</i>	88
<i>III.2.5. Proliferación celular.....</i>	92
<i>III.2.6. Actividad de la fosfatasa alcalina.....</i>	95
<i>III.2.7. Comportamiento de los vidrios sin recubrir y recubiertos con CHA en cultivos de osteoblastos.....</i>	96

IV. HÍBRIDOS ORGÁNICO-INORGÁNICO BASADOS EN VIDRIOS SOL-GEL Y POLIALCOHOL VINÍLICO.....	102
IV.1. Síntesis de los híbridos.....	103
IV.2. Caracterización de los híbridos.....	105
IV.3. Estudios <i>in vitro</i>.....	110
<i>IV.3.1. Degradación.....</i>	<i>110</i>
<i>IV.3.2. Bioactividad.....</i>	<i>111</i>
IV.4. Comparación entre los híbridos y los vidrios sol-gel.....	115
IV.5. Comportamiento <i>in vitro</i> de los híbridos en SBF estático.....	117
IV.6. PVAL como inductor de porosidad en vidrios sol-gel.....	119
V. RESUMEN.....	121
V.1. Síntesis, caracterización y bioactividad <i>in vitro</i> de vidrios sol-gel.....	122
V.2. Reactividad de los vidrios en nuevos protocolos <i>in vitro</i>.....	123
V.3. Biocompatibilidad de los vidrios en cultivos de osteoblastos.....	124
V.4. Híbridos orgánico-inorgánico basados en vidrios sol-gel y polialcohol vinílico.....	125
VI. CONCLUSIONES.....	126
VII. APÉNDICES.....	129
A. El método sol-gel para la síntesis de materiales.....	130
<i>A.1. Introducción.....</i>	<i>130</i>
<i>A.2. Etapas del proceso sol-gel.....</i>	<i>131</i>
<i>A.3. Ventajas y desventajas del proceso sol-gel.....</i>	<i>137</i>
B. Técnicas instrumentales.....	139
C. Protocolo de preparación de SBF.....	146
D. Publicaciones y congresos.....	147
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	150

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Técnicas:

ATG	Análisis termogravimétrico
ATR	Reflexión total atenuada
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
DRX	Difracción de rayos-X
EDX	Espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X
FRX	Fluorescencia de rayos-X
IRTF	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
MEB	Microscopia electrónica de barrido
UV/vis	Espectroscopia de ultravioleta/visible

Compuestos químicos:

CHA	Carbonato hidroxiapatita
CSIP	Plasma inorgánico simulado carbonatado
PVAL	Polialcohol vinílico
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TEP	Trietil fosfato
TRIS	Tris(hidroximetilamino) metano/HCl

Ensayos de bioactividad y biocompatibilidad:

DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
PBS	Disolución tampón de fosfatos
SBF	Fluido corporal simulado
SDS	Dodecilsulfato de sodio

Capítulo I: Introducción

I.1. Materiales para sustitución de tejido conectivo: Situación actual y perspectivas de futuro

Muchas enfermedades y lesiones requieren una intervención quirúrgica para implantar un biomaterial o un dispositivo médico. En general, los índices de éxito de dichas intervenciones en Ortopedia y Odontología son elevados, pero todavía hay aspectos mejorables entre los que cabe destacar el diseño de técnicas quirúrgicas menos agresivas, la anticipación del tratamiento de las enfermedades degenerativas y la mejora de los biomateriales y dispositivos implantables. En la última década, el diseño de los biomateriales está experimentando una gradual evolución desde la Ingeniería de Materiales hacia los dispositivos basados en la *Ingeniería de Tejidos*.

I.1.1. Biomateriales basados en Ingeniería de Materiales

Tradicionalmente los implantes se han utilizado para sustituir tejidos vivos muy degenerados y produciendo dolor. Esta aproximación sigue siendo válida. A estos dispositivos implantables prácticamente lo único que se les exige es que cumplan ciertos *requerimientos mecánicos* y no se aprovechan las potentes fuerzas regeneradoras del organismo. Sin embargo, estos implantes funcionan muy bien en términos generales.¹

Asimismo, los implantes deben permanecer mucho tiempo en el cuerpo, aportando las propiedades mecánicas requeridas, sin causar efectos adversos al paciente, por lo que también deben ser *biocompatibles*. Este aspecto se ha interpretado tradicionalmente como la necesidad de que sean *inertes* en el entorno fisiológico. Un material *biocompatible* no debería ser tóxico, ni irritante, ni alergénico, ni carcinogénico, ni trombogénico, etc.

La combinación *propiedades mecánicas-biocompatibilidad* ha guiado la evolución de los biomateriales que ha llevado a un conjunto de materiales casi *inertes* que se utilizan para fabricar implantes: cerámicas (alúmina, zirconia,...) polímeros (polietileno, polimetilmetacrilato,...) metales (aceros, cromo-cobalto, titanio,...) y materiales compuestos obtenidos por combinación de los anteriores. Los biomateriales tradicionales cumplen en general las funciones requeridas si exceptuamos el elevado desgaste de las superficies articulares en las prótesis de articulaciones. Sin embargo, estos biomateriales no mantienen las funciones requeridas indefinidamente ya que, incluso los más *inertes*, interactúan con los tejidos vivos y acaban degradándose. Por otra parte, precisamente por su mínima reactividad, estos materiales no se integran en el organismo al no enlazarse con los tejidos vivos. Por ello, en un plazo más o menos largo, todas las prótesis para sustitución ósea con materiales casi *inertes* tienden a producir inflamación crónica o a fracasar.¹

1.1.2. Dispositivos diseñados para interactuar con el organismo: Ingeniería de Tejidos

La respuesta a las limitaciones de los biomateriales tradicionales sienta las bases para la *Ingeniería de Tejidos*, al considerar que la reactividad implante-huésped no sólo es inevitable sino que es deseable, por lo que hay que diseñar y utilizar dispositivos que optimicen esa interacción. El primer paso en este sentido fue el diseño de materiales capaces de interactuar químicamente con los tejidos vivos formando una interfaz enlazante. Dichos materiales reciben el nombre de *bioactivos* siendo el Bioglass^{®2} el primero en ser sintetizado por Hench y col. en 1971.³ Un intercambio iónico entre el vidrio y los fluidos fisiológicos inicia una serie de reacciones que conducen a un enlace entre el vidrio y el hueso.² Hasta el momento se ha descrito bioactividad para otras

cerámicas, entre ellas la hidroxiapatita^{4,5} y ciertas composiciones de vitrocerámicas.⁶ Asimismo se ha descrito bioactividad, aunque en ocasiones sólo en condiciones *in vitro*, para diversos materiales compuestos⁷ e híbridos orgánico-inorgánico.⁸

Algunos aspectos del *transplante de tejidos u órganos* ayudan a entender el potencial de la *Ingeniería de Tejidos*. En estos trasplantes el donante puede ser: el propio paciente (piel) un humano vivo compatible inmunológicamente (médula ósea) un humano muerto (órganos y productos de bancos de tejidos) o un animal (órganos y tejidos xenogénicos). Hay casos, como los trasplantes de córnea o de válvulas cardíacas porcinas donde las tasas de éxito son muy elevadas, pero, en general, todavía quedan múltiples inconvenientes por resolver: inmunológicos, logísticos, éticos y derivados de la posible transmisión de agentes infecciosos (virus, priones). Por otra parte, aún restan numerosos aspectos políticos y éticos por resolver para la utilización de animales transgénicos o la clonación terapéutica. Los trasplantes han mostrado que algunos tejidos, (piel, hueso) tienen una capacidad de regeneración muy alta, aunque en extensión limitada, mientras que otros (cartílago, nervio) la tienen más restringida y hay que utilizar técnicas que los estimulen a autorrepararse. Además, se ha comprobado que es mejor transplantar tan sólo los componentes activos de los tejidos responsables de la regeneración tisular, proporcionándoles las condiciones óptimas para que regeneren el tejido.¹ En este sentido, se pueden mencionar ciertas proteínas como la proteína morfogenética ósea, factores de crecimiento o las células madre, muy debatidas actualmente.

La *Ingeniería de Tejidos* se puede considerar un puente entre los implantes de biomateriales tradicionales, cuya mejora vendría de la introducción de una cierta reactividad controlada, y el transplante de tejidos, cuya efectividad aumenta si se implantan sólo los componentes activos. La *Ingeniería de Tejidos* emplea biomateriales conjuntamente con los componentes celulares responsables del crecimiento y reparación de los tejidos, para que su combinación, frecuentemente llamada *constructo*, ayude al paciente a regenerar nuevo tejido funcional. El biomaterial puede ser o no biodegradable y los componentes celulares pueden ser células, biomoléculas o ambas simultáneamente, lo que da una idea de la amplia variedad de *constructos* que pueden utilizarse en *Ingeniería de Tejidos*.¹

En 1998 Williams define la *Ingeniería de Tejidos* como: “la persuasión al cuerpo de curarse a sí mismo mediante la liberación en los sitios apropiados de señales moleculares, células y estructuras soportantes”.⁹

No es obvio saber a qué puede considerarse un producto de *Ingeniería de Tejidos*. Los biomateriales convencionales se fabrican de acuerdo a unas normas ingenieriles y están sometidos a una estricta regulación. En el caso de los transplantes existen claras guías profesionales y éticas de actuación. Sin embargo, las reglas para la utilización de productos de *Ingeniería de Tejidos*, que pueden ser cosas tan diferentes como soportes poliméricos biodegradables, geles de colágeno o biomoléculas sintéticas, están surgiendo en la actualidad. En las Tablas I y II se recogen respectivamente la clasificación de los productos de *Ingeniería de Tejidos* y las aplicaciones de *Ingeniería de Tejidos* en Ortopedia que han sido elaboradas a partir de los trabajos de Lysaght y col.¹⁰ y Williams.¹

Tabla I: Tipos de productos de *Ingeniería de Tejidos*. Elaborado a partir de Lysaght y col.¹⁰

Productos	Ejemplos de <i>constructos</i>
Estructurales	<ul style="list-style-type: none">• Suspensión de fibroblastos o condrocitos en un gel de colágeno, alginato o hialuronato• Biomateriales con biomoléculas• Biomateriales <i>bioactivos</i>
<i>Constructos</i> activos protegidos	<ul style="list-style-type: none">• Células microencapsuladas• Células xenogénicas protegidas por una membrana semipermeable
Transplante de células	<ul style="list-style-type: none">• Transplante de condrocitos para reparación de cartílago

Tabla II: Aplicaciones ortopédicas de la *Ingeniería de Tejidos*. Adaptado de Williams.¹

Tipo de defecto	Constructos	Ejemplos
A. Sustitución de articulaciones	Prótesis convencionales mejoradas con moléculas osteogénicas	Prótesis de superficie porosa + moléculas osteogénicas Recubrimientos bioactivos + biomoléculas Recubrimientos bioactivos porosos + biomoléculas
	Materiales bioactivos	Hidroxiapatita (HA) Biovidrios en forma de partículas
	Materiales derivados del hueso	Autoinjerto viable Alloinjerto/xenoinjerto
B. Relleno de defectos óseos	Moléculas osteogénicas	Moléculas liberadas por el biomaterial Moléculas osteogénicas del paciente concentradas por el biomaterial
	Células	Osteoblastos derivados del paciente (con y sin soporte) Células madre derivadas del paciente
	Material derivado del cartílago	Autoinjerto pericondral Autoinjerto osteocondral Alloinjerto osteocondral
C. Reparación de cartílago	Células	Condrocitos Con portador (con y sin moléculas condrogénicas) Sin portador (con y sin moléculas condrogénicas) Células madre derivadas del paciente
D. Reparación de tendones y ligamentos	Células	Células diferenciadas Células madre derivadas del paciente

A continuación, se amplían los tipos de aplicaciones de la *Ingeniería de Tejidos* en Ortopedia que se muestran en la Tabla II.

A. Sustitución de articulaciones

Las articulaciones más sustituidas son de cadera y rodilla, y en menor proporción de codo, hombro, tobillo, muñeca y dedos. En estos casos, el implante debe sostener las fuerzas transmitidas por la articulación durante las actividades cotidianas. Si sólo se considera este aspecto, las prótesis convencionales funcionan bien, por lo que no es de esperar que los implantes para la sustitución de articulaciones deriven de productos de *Ingeniería de Tejidos*. Las principales aportaciones de la *Ingeniería de Tejidos* a este apartado serán las que promuevan crecimiento o remodelación ósea en la interfaz hueso-implante.

B. Relleno de defectos óseos

La *Ingeniería de Tejidos* es poco adecuada para sustituir estructuras óseas que soportan cargas, pero permite la regeneración de hueso en defectos de tamaño pequeño o medio. Por ello, se utilizará en los casos en los que el defecto no vaya a recibir fuerzas excesivas durante las actividades cotidianas.

C. Reparación de defectos de cartílago

Para la reparación de cartílago la situación debería ser similar a la anterior, pero en la práctica las opciones están más restringidas. En este caso el empleo únicamente de biomateriales no ha dado resultado, debiendo utilizarse una combinación del biomaterial con células o biomoléculas.

D. Reparación de tendones y ligamentos

Se ha publicado muy poco sobre la reparación de tendones y ligamentos con productos de *Ingeniería de Tejidos*, aunque se esperan resultados similares a los que se están obteniendo para cartílago.

I.2. Vidrios bioactivos

De todos los materiales utilizables como implantes bioactivos o soportes en *Ingeniería de Tejidos* nos vamos a centrar en los vidrios bioactivos, principal objeto de esta tesis. Las características de estos vidrios que los hacen candidatos a ser utilizados como biomateriales son su bioactividad, biocompatibilidad, su porosidad y su capacidad de reabsorción parcial degradándose en productos también biocompatibles.¹¹

I.2.1. Estructura de los vidrios

Los vidrios son materiales de carácter amorfo que contienen un elemento de estado de oxidación elevado, capaz de formar una red tridimensional infinita, que recibe el nombre de *formador de red*, siendo el silicio el más común. La estructura de los vidrios de silicato está formada por tetraedros [SiO₄] unidos por los vértices. Mientras que la sílice cristalina muestra una disposición uniforme de estos tetraedros (tal y como podría esperarse para cualquier material cristalino) Figura 1 (a) éste no es el caso en la sílice amorfa como se muestra en la Figura 1 (b).

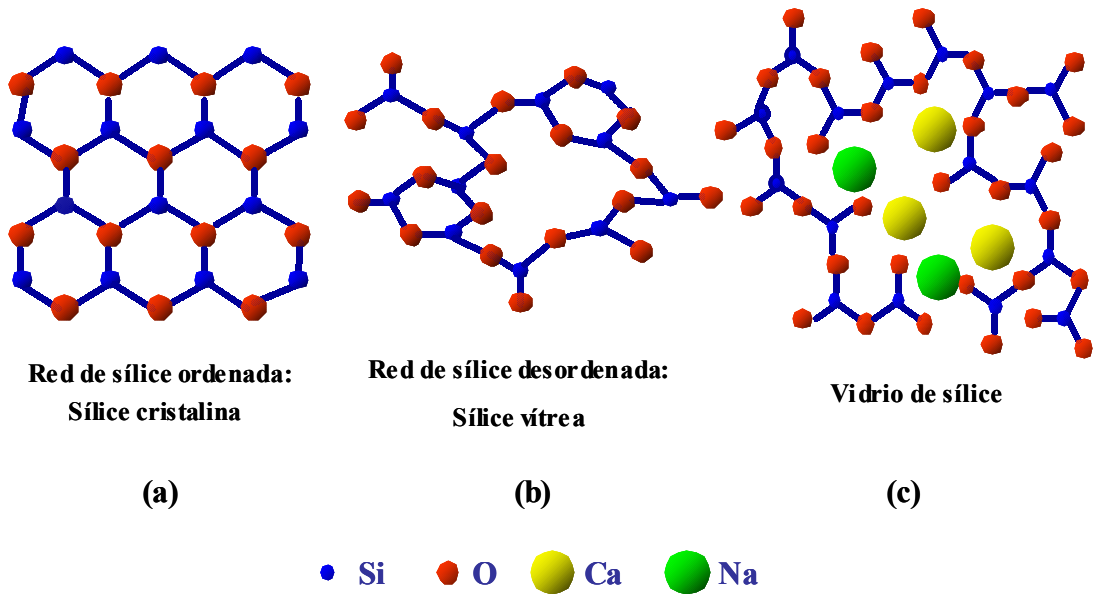


Figura 1: Representación bidimensional de (a) red cristalina de SiO_2 , (b) red de SiO_2 vítrea y (c) red de sílice con modificadores de red. En los tres casos el cuarto átomo de oxígeno de cada tetraedro $[\text{SiO}_4]$ se encuentra situado en un plano superior o inferior.

Una característica común tanto a las estructuras cristalinas como a las amorfas es que cada oxígeno une dos tetraedros, aunque formando una disposición más abierta en la sílice amorfa. Tal estructura abierta facilita la inclusión de cationes conocidos como *modificadores de red*, y esta característica permite obtener un amplio margen de composiciones de vidrios (Figura 1 (c)).

La presencia de cationes como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} causa una discontinuidad en la red del vidrio a través de la ruptura de algunos enlaces siloxano (Si-O-Si). Como consecuencia de ello, se forman oxígenos no enlazantes. El propósito de los *formadores de red* es construir una red tridimensional donde, en el caso de los vidrios de silicato, están presentes los enlaces Si-O-Si , mientras que el de los *modificadores de red* es romper una proporción de estos enlaces originando los denominados oxígenos no enlazantes, permitiendo que el fundido solidifique con un mayor grado de desorden.¹²

Esta estructura desordenada, donde el desorden se incrementa como consecuencia de la presencia de *modificadores de red*, da lugar a la alta reactividad de estos vidrios en medios acuosos. Dicha reactividad es la causa de sus aplicaciones en la reparación periodontal y el relleno óseo, ya que los productos obtenidos por la reacción de estos vidrios con los fluidos fisiológicos dan lugar a la formación en su superficie de carbonato hidroxiapatita similar al componente inorgánico de los huesos de especies vertebradas. Es decir, son bioactivos.¹³⁻¹⁸

1.2.2. Vidrios sol-gel bioactivos

Los primeros vidrios bioactivos, que se prepararon por enfriamiento rápido de fundidos, contenían SiO_2 y P_2O_5 , como *formadores de red*, y CaO y Na_2O , como *modificadores de red*.¹² Este método ha sido utilizado desde entonces para la síntesis de vidrios bioactivos.¹⁹⁻²⁴ Sin embargo, a principios de los 90, se propuso el proceso sol-gel para la síntesis de vidrios bioactivos. Este proceso, que utiliza temperaturas mucho más bajas que el método de fusión, permite obtener vidrios de mayor pureza y homogeneidad, expandir el rango de composiciones bioactivas y mejorar las propiedades texturales (superficie específica y porosidad). Los vidrios sol-gel no requieren Na_2O cuyo principal papel en los de fusión es disminuir la temperatura de fusión de la mezcla, por ello, los primeros vidrios sol-gel bioactivos se prepararon en el sistema ternario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$. Asimismo, el método sol-gel ha permitido simplificar el sistema ternario, eliminando el P_2O_5 , y obtener vidrios binarios CaO-SiO_2 bioactivos en un amplio intervalo de composiciones.²⁵ Hay que tener en cuenta que por fusión sólo se pueden preparar vidrios CaO-SiO_2 con un 65 %-mol de SiO_2 como máximo. Para contenidos de SiO_2 mayores se produce separación de fases. Sin embargo, por sol-gel se pueden preparar vidrios binarios hasta con un 90 %-mol de SiO_2 .

Por otra parte, en vista de la excelente bioactividad de los vidrios sol-gel, su campo de aplicación se ha expandido mediante la preparación de materiales mixtos, en los que estos vidrios son los elementos inductores de bioactividad. Así se han obtenido: (i) sistemas bioactivos para liberación controlada de fármacos: antiinflamatorios y antibióticos,²⁶⁻³¹ (ii) materiales magnéticos bioactivos para el tratamiento de tumores óseos mediante hipertermia,^{32,33} y (iii) materiales basados en fosfatos de calcio con un aumento en la bioactividad debido a la presencia del vidrio bioactivo.³⁴⁻³⁶

Otra importante aplicación del método sol-gel es la preparación de recubrimientos de sustratos metálicos (de Ti6Al4V) con vidrios bioactivos por el método de inmersión o dip-coating. Dichos recubrimientos permiten combinar las buenas propiedades mecánicas de los metales con la bioactividad de los vidrios sol-gel.³⁷

I.3. Bioactividad *in vivo* frente al comportamiento *in vitro*

Los vidrios bioactivos se evaluaban inicialmente mediante su implantación en animales de experimentación y comprobando que se producía una unión con el hueso mecánicamente fuerte. En la actualidad se han propuesto diversos ensayos *in vitro* que permiten una evaluación de los materiales antes de los ensayos *in vivo*. Entre los ensayos *in vitro* se pueden mencionar los de bioactividad y los de biocompatibilidad, estos últimos, realizados mediante cultivos celulares.

Así, se ha establecido una relación entre la capacidad de un material de formar una capa de carbonato hidroxiapatita (CHA) tras sumergirlo en un fluido fisiológico simulado y su capacidad de enlazarse a los tejidos vivos.¹⁶ Esto ha convertido a los denominados ensayos de bioactividad *in vitro* en ensayos preliminares de caracterización de nuevos materiales candidatos para utilizar en implantes.³⁸

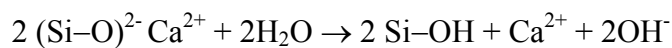
En la mayoría de los casos, los ensayos *in vitro* de bioactividad se realizan en Simulated Body Fluid (SBF) fluido corporal simulado propuesto por Kokubo y sus colaboradores.¹⁶ El SBF es una solución acuosa acelular con una composición iónica similar a la del plasma humano, tamponada a pH fisiológico (7.25-7.40) a 37°C con una mezcla de HCl/tris(hidroximetil) aminometano.¹⁶ La composición y protocolo de preparación del SBF se indican en el apéndice C de esta memoria.

Como se verá en la Tabla III, los estudios *in vitro* han permitido grandes avances en el conocimiento del mecanismo de formación de la capa tipo apatita sobre la superficie de los vidrios bioactivos. Así, está bien establecida la formación de una capa rica en silicio en la superficie de vidrio sobre la que se deposita otra capa rica en fosfato

de calcio.³⁹⁻⁴³ El proceso tiene lugar a través de la superficie libre del vidrio, así aquellos factores responsables de un aumento en la superficie específica del vidrio inicial también promueven una aceleración en la cinética de la reactividad *in vitro* de los vidrios bioactivos. Ésta fue, de hecho, una de las principales razones para la búsqueda de nuevas rutas para la síntesis de vidrios, como el método sol-gel, con el que se obtenían materiales con altas superficie específica y porosidad.⁴⁴⁻⁴⁸

1.3.1. Influencia de la composición y textura en la bioactividad in vitro

La alta porosidad en los vidrios sol-gel favorece la formación de la capa apatita, ya que facilita el rápido y masivo intercambio de iones Ca^{2+} del vidrio por H_3O^+ de la disolución. Este intercambio incrementa la saturación de Ca^{2+} y el pH en el medio, e induce la formación de grupo silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio de acuerdo con la siguiente ecuación:



La formación de la capa rica en silicio es casi instantánea y se recubre en pocos minutos con una capa de fosfato de calcio amorfo, que en unos dos o tres días (según composición) cristaliza con una estructura tipo apatita. Estos procesos también producen porosidad adicional, que facilita la difusión de más iones Ca^{2+} al medio y la formación de nuevos grupos silanol. Hay, sin embargo, otros factores que contribuyen a estas reacciones. El CaO es un *modificador de red*, por tanto, induce inestabilidad en el sistema provocando tensiones en la estructura vítrea. Por tanto, un mayor contenido en CaO en el vidrio implica una cinética más rápida de formación de la capa apatita.¹²

La presencia de CaO se asocia también con una mayor porosidad en el vidrio sol-gel, especialmente cuando éste se adiciona en forma de sal inorgánica como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ cuyos aniones, grupos NO_3^- , quedan atrapados en la red del vidrio de donde se eliminan mediante un tratamiento a alta temperatura, que generará una porosidad adicional a la propia del proceso sol-gel.⁴⁹

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de un nuevo modificador de red, MgO, en vidrios $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.¹² Se ha comprobado que el MgO modifica las propiedades texturales y disminuye la bioactividad de los vidrios sol-gel, al tiempo que incrementa la complejidad del sistema, por lo que su utilización fue desechada.⁵⁰

Se han sintetizado vidrios binarios, CaO-SiO_2 , con contenidos en SiO_2 entre 50 y 90 %-mol mediante el método sol-gel y donde el fósforo no está presente como componente del vidrio. Los estudios de bioactividad *in vitro* mostraron en todos los casos la formación de una capa tipo apatita. Estos resultados pusieron de manifiesto que la presencia de P_2O_5 en vidrios bioactivos no es esencial para obtener un comportamiento bioactivo, incluso para contenidos en SiO_2 muy altos.^{25,51,52}

Por otra parte, se ha propuesto un método para cuantificar y predecir la bioactividad de los vidrios de silicato. El método relaciona la degradación de la red de sílice con los factores que causan la formación de grupos silanol en la superficie del vidrio.⁵³ Dichos factores son principalmente la *composición* del vidrio (cantidad de modificadores de red: CaO , Na_2O ,...) ^{51,54,55} y sus *propiedades texturales* (superficie específica y porosidad).^{56,57} Se ha relacionado la energía de activación (E_a) para la difusión de $\text{Si}(\text{OH})_4$,⁵⁸ la forma soluble de SiO_2 , con la bioactividad de los vidrios sol-

gel. Con este método se estudiaron vidrios de fusión y sol-gel observándose que presentaban bioactividad *in vitro* cuando la E_a para la difusión de $\text{Si}(\text{OH})_4$ era menor que 0.35 eV.⁵⁹

1.3.2. Nuevos protocolos *in vitro*

Durante los estudios *in vitro* descritos anteriormente, la solución de ensayo no se renovó por lo que los iones liberados desde el vidrio permanecieron en el recipiente durante todo el ensayo. Este método se denomina *estático* o *integral*.⁶⁰ Sin embargo, cuando se estudian materiales con alta reactividad en medio acuoso, los análisis de las soluciones muestran variaciones en la composición iónica durante el ensayo. Por ello, algunos autores han propuesto el llamado método *diferencial* en el que la disolución se renueva a intervalos predeterminados.⁶⁰ Para vidrios sol-gel, los estudios de nuestro grupo han demostrado que la sustitución de la disolución debería ser a intervalos de tiempo tan cortos que las manipulaciones de la muestra afectarían al proceso de formación de la capa CHA.

Por esta razón, para simular el continuo flujo de los fluidos corporales en la superficie del implante, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis propuso un nuevo procedimiento *in vitro dinámico* en el cual el SBF se renueva continuamente con ayuda de una bomba peristáltica.^{61,62} Utilizando un protocolo *dinámico* se estudiaron vidrios sol-gel y se comprobó que, la formación de la capa de fosfato amorfo inicial se detectaba tras tiempos de ensayo mayores, pero que el tamaño de los cristales CHA formados más tarde era mayor que en *estático*. En cuanto a la composición de la capa, en el modo *dinámico* no se detectaron trazas de silicio y la relación Ca/P fue considerablemente menor que en *estático*. Ello se explicó

considerando el menor pH que se alcanza en *dinámico* (7.4) que aumenta la concentración de HPO_4^{2-} en solución comparado con las condiciones estáticas donde el pH se aproxima a 8 tras 7 días de ensayo. En este sentido, el empleo del *dinámico* favorecería la formación de apatita deficiente en calcio, que podría coexistir con otros fosfatos de calcio de menor relación Ca/P.^{61,62}

Por otra parte, el SBF propuesto por Kokubo está tamponado a pH 7.3-7.4 con tris(hidroximetil) aminometano/HCl, un tampón no fisiológico. Este tampón es efectivo pero introduce altas concentraciones de ion Cl^- en la solución, que no se consideran en el cálculo de la concentración total de cloruros del SBF. Por otra parte, la base orgánica no es un producto natural y también se ha publicado que forma complejos con el Ca^{2+} ,⁶³ lo que afectará al proceso de formación de CHA.⁶⁴

La otra diferencia entre la composición de iones inorgánicos del SBF y el plasma fisiológico es la concentración de HCO_3^- , 4.2 mM en el SBF, y 27 mM en plasma. La concentración de HCO_3^- influye en el proceso de mineralización.⁶⁴ Hay que tener en cuenta que a presión atmosférica la máxima cantidad de ion bicarbonato que puede disolverse es precisamente la presente en el SBF.

Para solventar los dos problemas anteriores se propuso un nuevo protocolo de ensayo *in vitro* que utiliza el denominado Plasma Inorgánico Simulado Carbonatado, CSIP.⁶⁴ En este protocolo el pH de la disolución se mantiene entre 7.3 y 7.4 burbujeando una mezcla de las cantidades apropiadas de N_2/CO_2 para ajustar la presión parcial de CO_2 entre 5.0 y 7.2 KPa lo que, además, permite alcanzar una concentración de HCO_3^- en disolución idéntica a la fisiológica (27 mM).⁶³

I.4. Biocompatibilidad de vidrios sol-gel

I.4.1. Cultivos celulares

Previo a los ensayos *in vivo* hay que evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de los nuevos candidatos a materiales implantables. Para ello, una de las mejores aproximaciones es la utilización de cultivos celulares. Estos estudios proporcionan información valiosa sobre el efecto de los materiales en el comportamiento celular.⁶⁵

Cuando se considera la biocompatibilidad de los vidrios sol-gel, el empleo de cultivos de osteoblastos presenta un especial interés ya que la principal aplicación de estos materiales es la sustitución ósea. En general, los vidrios bioactivos promueven los procesos celulares mejor que otros biomateriales.⁶⁶⁻⁷⁰

Algunos de los aspectos más estudiados habitualmente son la *adhesión*, *extensión* y *proliferación* celular. La *adhesión* de las células al sustrato es la primera etapa en el proceso de interacciones celulares y afecta las reacciones tisulares subsiguientes.⁷¹ Por otra parte, una pobre *adhesión* a los implantes ortopédicos y dentales puede conducir al fallo de un implante.⁷² La *extensión* es una función de la célula que se ha adherido a una superficie y precede a la *proliferación*.⁷³ Es una etapa importante para propiedades biológicas esenciales de la célula tales como la mencionada *proliferación* celular. Por tanto, cuando se analiza la biocompatibilidad de un material no sólo se debe considerar el proceso de *adhesión* celular sino también si el material permite el desarrollo de procesos morfogénicos normales. Los estudios de *extensión* implican el análisis de la morfología de las células. Cuanto mayor es el grado de *extensión* de la célula sobre el biomaterial mayor es la afinidad de las células por el

mismo. Los biomateriales que pueden soportar la *proliferación* celular promueven la diferenciación celular y la consiguiente formación de hueso.⁷⁴

En un trabajo reciente,¹¹ Shirliff y Hench han evaluado la capacidad osteogénica de un vidrio bioactivo en el sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, de nombre comercial Bioglass[®] 45S5, comparando el crecimiento de osteoblastos sobre el vidrio y sobre un material inerte y cuantificando las células en cada etapa del ciclo celular. Sobre el material inerte, los osteoblastos crecen y se adhieren pero no se diferencian ni se observa la formación de matriz ósea. Por el contrario, sobre el vidrio bioactivo el número de los osteoblastos crecidos fue mayor y se eliminaron por apoptosis las células incapaces de formar hueso nuevo. Además, se detectó la formación de matriz ósea mediante microscopía electrónica de barrido, MEB, y por la aparición de osteocalcina, proteína que se sintetiza al inicio de la mineralización.

Por otra parte, se puso de manifiesto que los productos de disolución del vidrio activan genes que codifican factores de transcripción del núcleo (necesarios para transformar las células madre en osteoblastos) factores de crecimiento, otras proteínas y proteasas. El control genético produjo un aumento en la *proliferación* y *diferenciación* de osteoblastos que tuvo como consecuencia clínica el rápido relleno de defectos óseos.^{11,75}

1.4.2. Estudios in vivo en animales de experimentación

Se han llevado a cabo diversos estudios *in vivo* para evaluar el comportamiento de vidrios sol-gel. Se puede mencionar un reciente estudio de nuestro grupo en colaboración con médicos de la Universidad de Zaragoza, en el que se han implantado piezas de vidrio sol-gel y vitrocerámica en el fémur de conejos jóvenes y adultos durante 16 semanas. Las piezas de ambos materiales presentaron excelente biocompatibilidad y oseointegración completa y muy baja respuesta inflamatoria, produciéndose la aposición directa al material de hueso neoformado.^{76,77}

Las Tablas III y IV recogen respectivamente los resultados de bioactividad y biocompatibilidad más destacados para vidrios sol-gel conocidos al inicio de este trabajo.

Tabla III: Aspectos de la **bioactividad** *in vitro* de vidrios sol-gel **conocidos** al inicio de este trabajo.

Aspecto estudiado	Resultado	Referencias	
Formación <i>in vitro</i> de CHA	Relacionada con la formación del enlace biomaterial-tejido <i>in vivo</i>	(39) Hench 77	
		(40) Anderson 90 (41) Schepers 89 (42) Anderson 91 (43) Ohura 92	
Mecanismo de formación de CHA	1. Intercambio de Ca^{2+} por H^+ del medio 2. Formación de grupos Si-OH 3. Formación capa rica en Si 4. Formación de fosfato de calcio amorfo 5. Cristalización de CHA	(2) Hench 91	
Efecto de la textura de vidrios sol-gel	Relacionada con la composición del vidrio Papel decisivo en la bioactividad Porosidad facilita liberación de Ca^{2+}	(12) Vallet-Regí 03 (56) Pérez-Pariente 99 (57) Balas 01	
Efectos de la composición en vidrios	Papel del CaO	Inestabiliza el sistema $\Rightarrow \uparrow$ cinética de formación de CHA $\text{Si CaO} \uparrow \Rightarrow \downarrow S_{\text{BET}}, \uparrow V_p$ y D_p	(49) Vallet-Regí 00 (12) Vallet-Regí 03
	Papel del MgO	Modifica textura, disminuye bioactividad Aumenta espesor capa, coprecipita β -TCP	(12) Vallet-Regí 03 (50) Pérez-Pariente 00
	Vidrios binarios SiO_2 -CaO	Bioactivos \Rightarrow formación de CHA P_2O_5 no es necesario	(51) Vallet-Regí 99 (52) Izquierdo-Barba 00 (25) Martínez 00
Modelo de predicción bioactividad para vidrios de silicato	Bioactivos cuando E_a de difusión de $\text{Si}(\text{OH})_4 < 0.35\text{eV}$	(53) Arcos 02 (59) Arcos 03	
Nuevos protocolos	Método diferencial	Mejor que el estático pero la renovación puede perturbar el sistema	(60) Falaize 99
	Método dinámico	Formación lenta de fosfato amorfo Cristales de CHA de mayor tamaño Ca/P menor	(61) Izquierdo-Barba 00 (62) Rámila 01
	CSIP	Aplicado sólo a cerámicas de fosfato de calcio	(63) Marques 03

Tabla IV: Aspectos de la **biocompatibilidad** de vidrios sol-gel **conocidos** al inicio de este trabajo.

Aspecto estudiado	Resultado	Referencias
Cultivos celulares Cultivos de osteoblastos, fibroblastos, condrocitos	Respuesta celular influida por la composición del vidrio Vidrios promueven la adhesión, extensión, proliferación y diferenciación celular Osteogénesis Vidrios substratos potenciales para Ingeniería de Tejidos.	(65) Ducheyne 99 (66) Loty 01
In vivo En defectos óseos creados en conejos	Excelente biocompatibilidad de los implantes Muy baja respuesta inflamatoria Ostointegración completa Aposición directa de hueso neoformado	(76) Meseguer-Olmo 02 (77) Gil-Albarova 04

I.5. Aspectos de los vidrios sol-gel bioactivos inéditos al inicio de este trabajo

Como se ha visto, se ha tratado de entender el papel de cada componente de los vidrios sol-gel en su bioactividad. En los vidrios $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ no está claro el papel del P_2O_5 en la textura y la bioactividad. Se intentó determinar el papel del P_2O_5 manteniendo constante la cantidad de SiO_2 en los vidrios y variando la de P_2O_5 a expensas de la de CaO .^{25,51} Sin embargo, el estudio de los vidrios binarios CaO-SiO_2 mostró que el P_2O_5 no era necesario para la bioactividad y también demostró que la cantidad de CaO juega un papel importante en la textura y en la bioactividad de los vidrios. Por tanto, estos estudios no permitieron distinguir si los efectos observados se debieron al aumento del P_2O_5 o a la disminución del CaO en el vidrio.

Por ello, el punto de partida de este trabajo fue mantener constante la cantidad de CaO e ir introduciendo distintas cantidades de P₂O₅ a costa de disminuir el contenido en SiO₂. Se seleccionó un 25 % en moles de CaO buscando una zona del diagrama de fases en la que la bioactividad estuviera asegurada para todas las composiciones preparadas, y que todas ellas fueran inéditas (Figura 2).

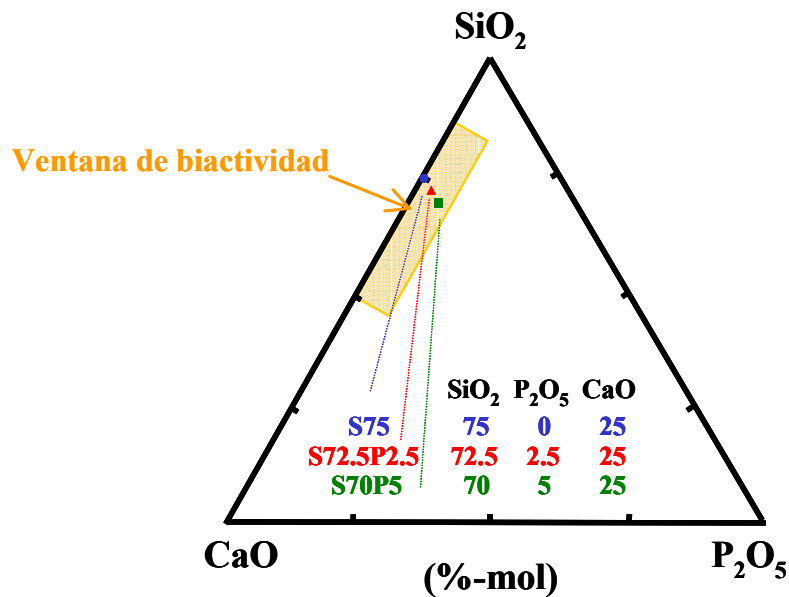


Figura 2: Diagrama de fases con las nuevas composiciones de vidrios sol-gel a estudiar.

De esta forma, con los resultados en vidrios CaO-SiO₂ y CaO-P₂O₅-SiO₂ con SiO₂ constante estudiados previamente y los obtenidos en vidrios de los mismos sistemas con contenido en CaO constante se podría determinar el papel de cada elemento en la bioactividad y particularmente, el del P₂O₅.

En este trabajo se realizará la caracterización fisicoquímica de los nuevos vidrios sol-gel y se estudiará su comportamiento *in vitro*, inicialmente en SBF *estático*, para confirmar su bioactividad.

Puesto que el protocolo de ensayo *in vitro* repercute en el comportamiento de los vidrios, tras el SBF *estático* iremos utilizando protocolos más complejos pero que simulen mejor las condiciones fisiológicas. Así, para evitar las drásticas variaciones iónicas en el SBF, consecuencia de la alta reactividad de los vidrios sol-gel en medios acuosos, se utilizará el método SBF *dinámico*, donde el SBF se renueva durante el ensayo. También se estudiará el comportamiento de estos vidrios en CSIP, donde la disolución reguladora del SBF, TRIS, se sustituye por el tampón fisiológico $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ burbujando con una mezcla de N_2/CO_2 para obtener una concentración de HCO_3^- en disolución de 27 mM y un pH de 7.3-7.4.

Por otra parte, la adsorción de proteínas sobre los implantes es esencial para entender tanto la *adhesión* celular como el proceso de regeneración del tejido óseo. Por tanto, otra aproximación al comportamiento *in vivo* sería añadir una proteína, como la albúmina (proteína más abundante en el plasma) a la disolución para los ensayos de bioactividad *in vitro*. Se estudiará el comportamiento de los vidrios sol-gel en SBF enriquecido con albúmina.

Hasta ahora no se ha hecho un estudio comparativo de la biocompatibilidad de varios vidrios sol-gel en presencia de cultivos de osteoblastos primarios. Dicho estudio comparativo implicaría el empleo de los nuevos vidrios recién preparados y tras haber sido sumergidos en SBF durante una semana, simulando así las reacciones químicas de

los vidrios bioactivos con los fluidos fisiológicos que pueden conducir a la generación de una nueva matriz ósea.

En la búsqueda de nuevos materiales implantables, además de la biocompatibilidad y la bioactividad, se investiga también la degradabilidad, evaluando la pérdida de peso de las muestras con el tiempo de inmersión en la disolución de ensayo.⁷⁸ Los vidrios sol-gel son materiales con reactividad superficial, por lo tanto, su degradación en masa, que depende del tamaño de partícula, es bastante pequeña. El combinar las propiedades de los vidrios con las de los polímeros orgánicos podría contribuir a mejorar las propiedades de los vidrios. Así, los nuevos materiales híbridos podrían usarse como relleno óseo y sistema de liberación controlada de fármacos en aquellas aplicaciones donde no se requiera soportar carga. La síntesis de materiales bioactivos y con una degradabilidad en medio acuoso prediseñada expandiría sus aplicaciones clínicas. Con ese propósito, una posibilidad es la síntesis de híbridos orgánico-inorgánico basados en los vidrios bioactivos estudiados en esta tesis y un polímero hidrofílico biocompatible, como el polialcohol vinílico, PVAL, que podría regular la degradación. De hecho, el PVAL ha sido propuesto ampliamente para sistemas de liberación controlada de fármacos debido a su biodegradabilidad.

En la Tabla V se recogen aspectos de los vidrios sol-gel y sus híbridos orgánico-inorgánico con PVAL inéditos al comienzo de este trabajo, indicando también el capítulo de la tesis en el que se tratan.

Tabla V: Aspectos de los vidrios bioactivos inéditos al inicio de este trabajo.

Aspectos a estudiar	Capítulo
<ul style="list-style-type: none">• Influencia del P₂O₅ en:<ul style="list-style-type: none">• Propiedades de los vidrios sol-gel (núcleos cristalinos, propiedades texturales...)• Comportamiento <i>in vitro</i>	II III
<ul style="list-style-type: none">• Comportamiento comparado de los vidrios en distintos protocolos <i>in vitro</i>:<ul style="list-style-type: none">• SBF estático• SBF dinámico• CSIP• SBF + alb• Biocompatibilidad en cultivos de osteoblastos de vidrios sol-gel recién preparados y tras recubrir con una capa de CHA	III
<ul style="list-style-type: none">• Síntesis, bioactividad, degradación de híbridos orgánico-inorgánico. Mejoras respecto a los vidrios. Papel de P₂O₅ y PVAL:<ul style="list-style-type: none">• Bioactividad• Degradación• Papel del PVAL como porógeno	IV

I.6. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido la síntesis y caracterización de nuevos materiales bioactivos por el procedimiento sol-gel, tanto vidrios como híbridos orgánico-inorgánico.

Para entender el efecto del P_2O_5 en las propiedades texturales, bioactividad y biocompatibilidad de los vidrios sol-gel se sintetizarán tres nuevos vidrios sol-gel con el mismo contenido en CaO (25 %-mol) y distintos contenidos en P_2O_5 , siendo el último componente el SiO_2 . Se estudiará la bioactividad de los vidrios utilizando distintos protocolos *in vitro* así como su biocompatibilidad en presencia de osteoblastos. Asimismo, se sintetizarán y caracterizarán híbridos orgánico-inorgánico basados en estos vidrios y polialcohol vinílico. Se estudiará su bioactividad y degradación *in vitro*.

Para alcanzar estos objetivos se abordarán las siguientes etapas:

- Síntesis y caracterización de tres vidrios sol gel con un 25 %-moles de CaO, contenidos de 0, 2.5 y 5 %-moles de P_2O_5 respectivamente y el resto de SiO_2 .
- Estudio comparativo del comportamiento de los vidrios en cuatro protocolos *in vitro*:
 - **SBF estático**
 - **SBF dinámico**
 - **Plasma Inorgánico Simulado Carbonatado (CISP)**
 - **SBF enriquecido con albúmina (SBF + alb)**

- Estudio de la biocompatibilidad de los vidrios sol-gel en presencia de cultivos celulares primarios de osteoblastos.
- Síntesis y caracterización de híbridos orgánico-inorgánico basados en estos vidrios sol-gel y polialcohol vinílico (PVAL).
- Estudio del comportamiento *in vitro* (bioactividad y degradación) de los materiales híbridos.

Capítulo II: Síntesis y caracterización de vidrios sol-gel con 25%-mol de CaO

II.1. Síntesis de los vidrios

Las soluciones iniciales para obtener los vidrios se prepararon a partir de las cantidades estequiométricas de tetraetil ortosilicato (TEOS, Aldrich[®]) trietil fosfato (TEP, Aldrich[®]) y Ca(NO₃)₃.4H₂O (Fluka[®]) que se muestran en la Tabla VI.⁷⁹

Las hidrólisis de TEOS y TEP se catalizó con HNO₃ 2N. Las cantidades de H₂O y HNO₃ se fijaron para obtener una proporción molar de HNO₃ + H₂O / TEOS + TEP = 8 y un pH inicial de 0.5. Los reactivos se fueron añadiendo consecutivamente en el orden siguiente: TEOS, TEP (cuando era necesario) y Ca(NO₃)₃.4H₂O. El TEOS y el TEP se añadieron gota a gota desde una bureta. Se dejó transcurrir una hora entre la adición de cada reactivo. Tras la mezcla con agitación de los reactivos, las soluciones resultantes se vertieron en recipientes de Teflón[®] que se cerraron herméticamente y se dejaron gelificar a temperatura ambiente durante 3 días. El envejecimiento de los geles se llevó a cabo en esos mismos recipientes, todavía cerrados, calentando a 70°C durante 3 días.⁷⁹

Tabla VI: Composición de los vidrios (% en moles) y cantidades de reactivos empleados en la síntesis.

	Código	S75	S72.5P2.5	S70P5
Composición (%-mol)	SiO ₂	75	72.5	70
	CaO	25	25	25
	P ₂ O ₅	0	2.5	5
Reactivos	TEOS (ml)	78	75.4	71.7
	TEP (ml)	-	3.8	7.6
	Ca(NO ₃) ₂ .4(H ₂ O)(g)	27.243	27.243	27.243
	H ₂ O (ml)	49.4	50.9	51.84
	HNO ₃ 2N (ml)	9.3	9.6	9.7

Los geles se secaron reemplazando las tapas de los recipientes por otras con un agujero de 1 mm de diámetro, para permitir la salida de los gases, y calentando a 150°C durante 2 días. Los geles secos se obtuvieron como piezas fracturadas que se molieron (en un molino Retsh S1) y se tamizaron, seleccionando la fracción de tamaño de grano comprendido entre 32 y 63 μm . A continuación se obtuvieron discos de 13 mm de diámetro y 2 mm de altura a partir de fracciones de 0.5 g, que fueron compactadas por medio de 75 MPa de presión uniaxial durante 3 minutos y 150 MPa de presión isostática durante 1 minuto. Las piezas obtenidas se calentaron durante 3 h a 700°C con objeto de eliminar los nitratos provenientes del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y estabilizar los geles secos obteniéndose de esta forma las piezas de vidrio (Figura 3).⁷⁹

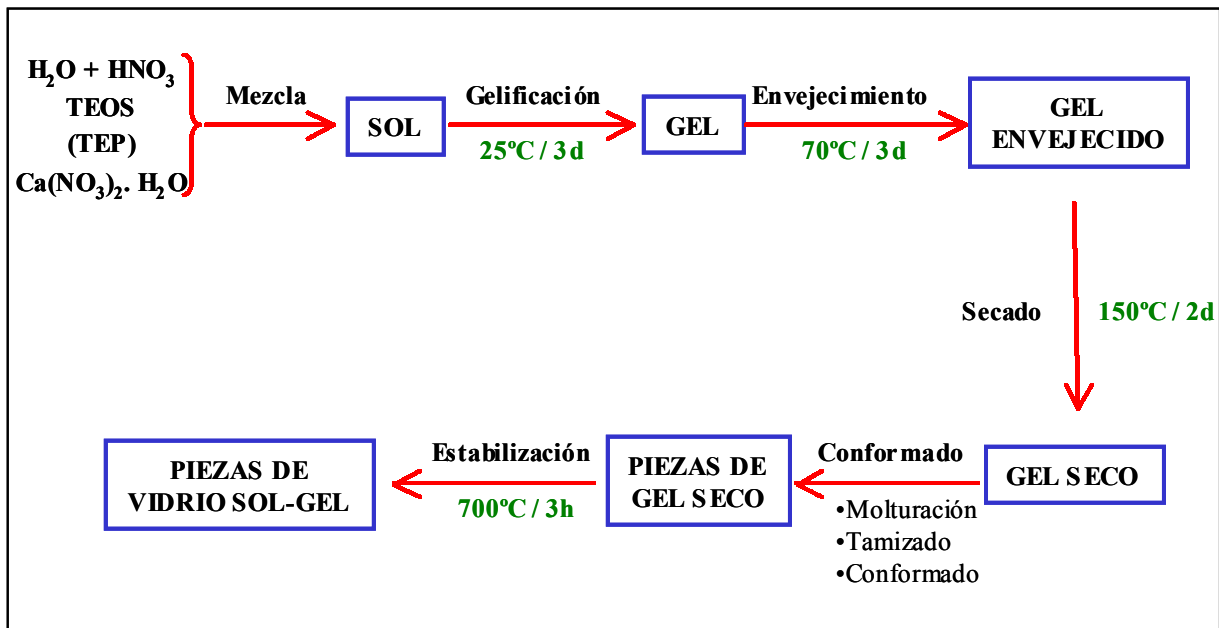


Figura 3: Esquema que incluye las diferentes etapas del proceso sol-gel para la síntesis de los vidrios.

II.2. Caracterización de los vidrios

Los geles secos precursores de los vidrios se caracterizaron por análisis termogravimétrico (ATG). Los vidrios se caracterizaron por difracción de rayos-X (DRX) espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF) microscopia electrónica de barrido (MEB) espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDX) porosimetría de intrusión de mercurio y de adsorción de nitrógeno.⁷⁹

II.2.1. Análisis termogravimétrico de los xerogeles (ATG)

Durante la síntesis de los vidrios, los geles se analizaron tras el secado mediante termogravimetría (ATG). Los resultados de dicho análisis se muestran en la Figura 4 y en la Tabla VII.

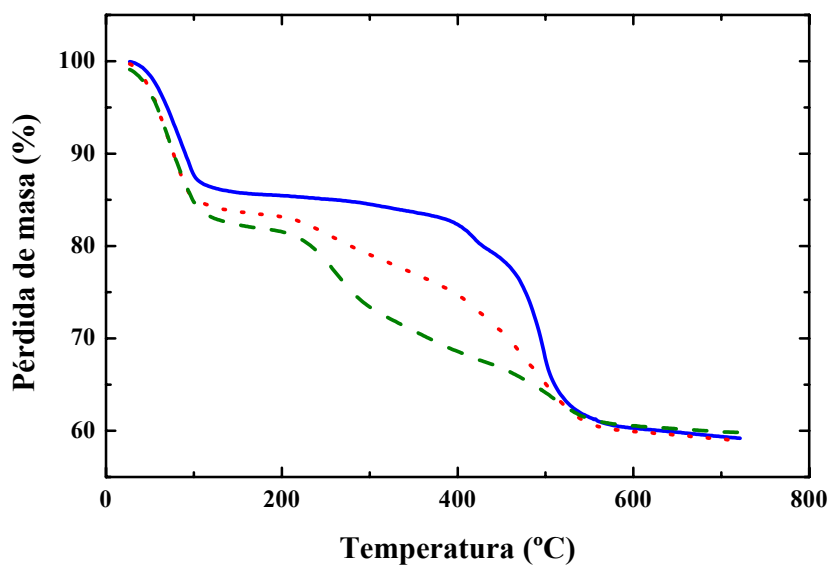


Figura 4: Termogramas de los geles secos en polvo **GS75**, **GS72.5P2.5** y **GS70P5** tras 2 días de secado a 150 °C.

— **GS75**, **GS72.5P2.5**, - - - **GS70P5**

Tabla VII: Porcentaje de masa perdida con la temperatura para cada gel seco.

Gel seco	1ª Etapa (25-140°C)	2ª Etapa (140-600°C)	Total
GS75	14.1	26.5	40.6
GS72.5P2.5	16.2	24.7	40.9
GS70P5	17.4	22.8	40.2

En los tres casos, se observa una primera pérdida de aproximadamente un 15 % entre temperatura ambiente y 140°C, atribuida a la eliminación de humedad y gases adsorbidos. A continuación, entre 140 y 700°C se detectó una pérdida de masa de un 25 % aproximadamente, asignada a la eliminación de nitratos. No se observó ninguna pérdida cuando la temperatura se aumentó hasta 1200°C para verificar la total eliminación de los nitratos. Por lo tanto, la temperatura de estabilización seleccionada para las piezas de vidrio fue 700°C (Figura 3).⁷⁹

II.2.2. Fluorescencia de rayos-X (FRX)

El contenido en óxidos de los vidrios se analizó por fluorescencia de rayos X. Los resultados obtenidos concuerdan con las composiciones nominales de los vidrios que se muestran en la Tabla VI.⁷⁹

II.2.3. Difracción de rayos-X (DRX)

Los difractogramas de DRX los vidrios (Figura 5) no contienen máximos de difracción definidos, lo cual es indicativo del desorden interno y de la naturaleza vítrea de estos materiales. Sólo existe un máximo de difracción difuso a 32° en 2θ en los difractogramas de los vidrios que contienen fósforo, S72.5P2.5 y S70P5. Dicho máximo se asignó a la reflexión (211) de una fase tipo apatita.^{79,80}

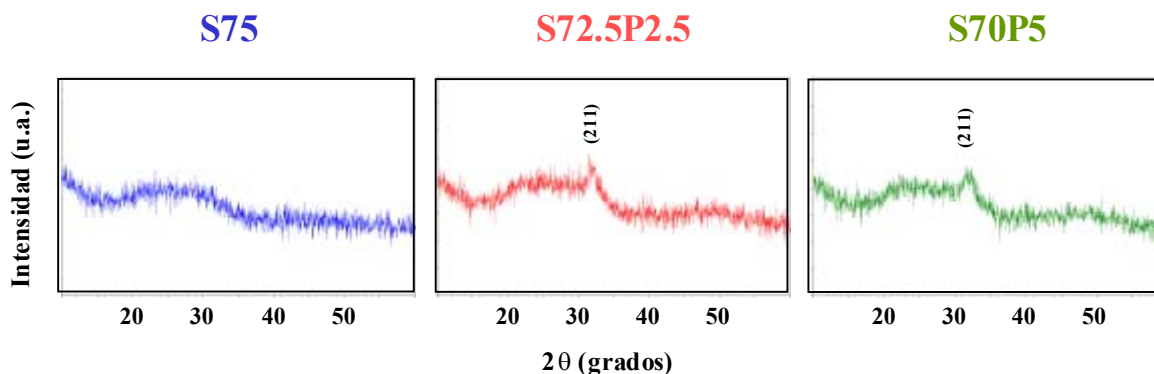


Figura 5: Difractogramas de rayos-X de los vidrios.

II.2.4. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF)

La Figura 6 muestra los espectros IRTF de **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5** obtenidos por reflectancia difusa. En el espectro de los vidrios están presentes las bandas de silicato a 1090, 940 y 780 cm^{-1} . La banda más intensa a 1090 cm^{-1} corresponde a la tensión asimétrica Si-O-Si, y la banda a 940 cm^{-1} a la tensión simétrica Si-O. La banda a 780 cm^{-1} es asignable a la tensión Si-O-Si tetraédrica. Además, los espectros de los vidrios que contienen fósforo muestran un doblete a 565-597 cm^{-1} , incipiente para **S72.5P2.5** y claramente definido para **S70P5**, característico de un fosfato cristalino.^{81,82}

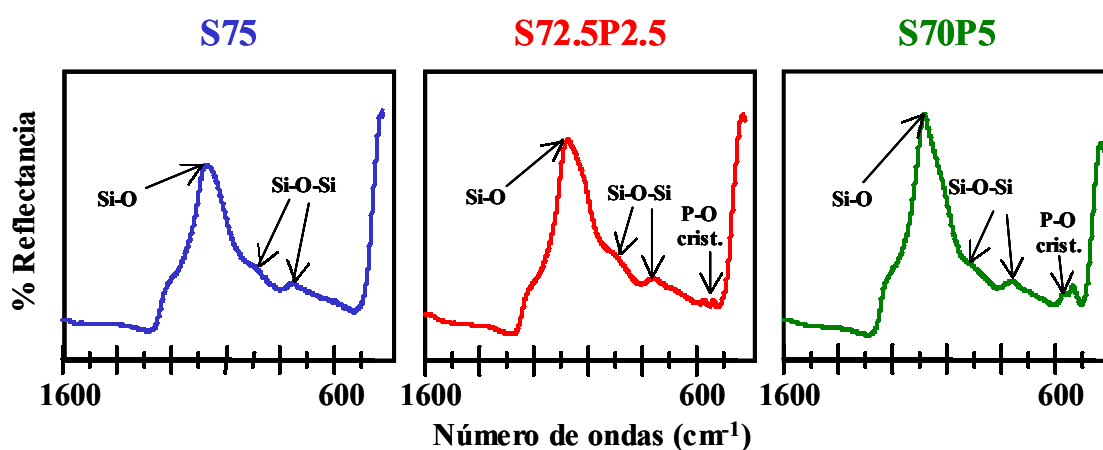


Figura 6: Espectros IRTF de los vidrios sol-gel.

II.2.5. Microscopia electrónica de barrido y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (MEB-EDX)

En la Figura 7 se muestran las micrografías de MEB y los espectros EDX de los vidrios. En las micrografías se ven superficies heterogéneas compuestas por partículas de diferentes tamaños con bordes agudos y huecos entre ellas. Los análisis EDX de las muestras concuerdan bastante con las composiciones nominales de los vidrios que se muestran en la Tabla VI.⁷⁹

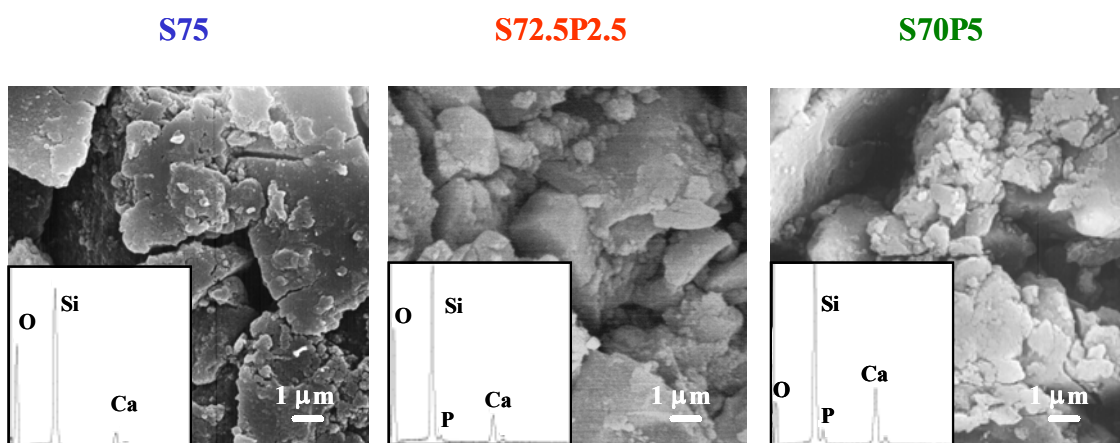


Figura 7: Micrografías MEB y espectros EDX de los vidrios sol-gel.

II.2.6. Porosimetría de intrusión de Hg

La Figura 8 muestra el volumen de mercurio intruido en función del diámetro de poro para S75, S72.5P2.5 y S70P5. La comparación entre la curva de S70P5 con las de los otros vidrios sugiere que, en este caso, no se alcanzó el máximo en el volumen de poro. Esto indicaría la presencia en esta muestra de poros con un diámetro inferior a 3 nm, el límite de la técnica. La distribución de tamaño de poro se muestra en el recuadro interior de la Figura 8. En todos los casos se observó una distribución bimodal con un máximo claramente definido en la región de mesoporos (D_p : 50-3 nm) y un segundo máximo entre 617 y 1221 nm en la región del mesoporo ($D_p > 50$ nm). En la Tabla VIII

se incluyen los valores de porosidad, volumen de poro, máximos en la distribución de tamaño de poro y densidad. Como puede observarse, el máximo en la región de mesoporos se desplaza de 9.9 a 3.6 nm a medida que el contenido en P₂O₅ en los vidrios aumenta.⁷⁹

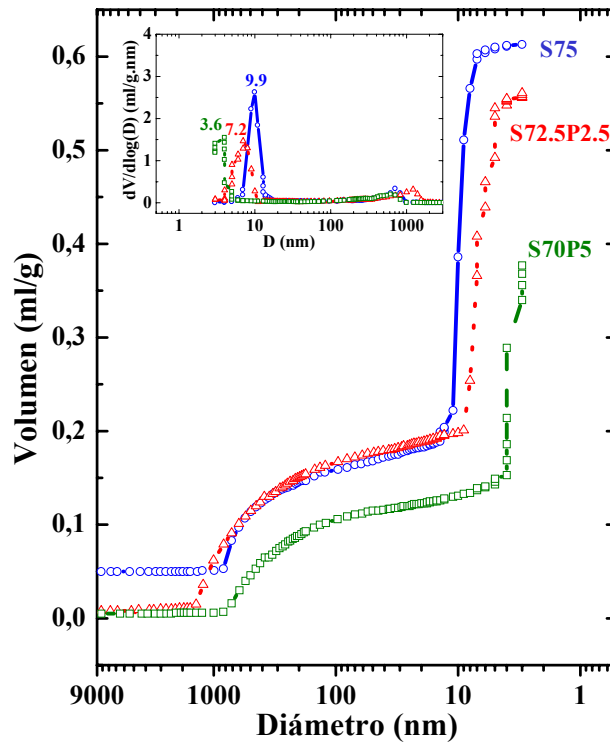


Figura 8: Volumen de Hg intruido en función del diámetro de poro para los vidrios sol-gel. Recuadro interior: Distribuciones de tamaño de poro.
 —○— S75, —△— S72.5P2.5, —□— S70P5

Tabla VIII: Propiedades texturales de los vidrios.

	N ₂			Hg					
	S _{BET} (m ² /g)	V _p (ml/g)	D _p (nm)	Porosidad ⁺ (%)	V [*] _{meso} (ml/g)	D _{p meso} (nm)	V [*] _{macro} (ml/g)	D _{p macro} (nm)	Densidad (g/ml)
S75	133	0.52	10.7	57.5	0.49	9.9	0.17	713	2.21
S72.5P2.5	153	0.42	8.7	57.2	0.39	7.2	0.18	1221	2.38
S70P5	327	0.43	4.0	44.1 ^{&}	0.26	3.6	0.11	617	2.09 ^{&}

+ Porosidad correspondiente a poros inferiores a 3 nm.

* *macroporos*: D_p>50 nm; *mesoporos*: en el intervalo 50-3 nm.

& Subestimado, ya que por adsorción de N₂ se observa un volumen de poro de 0.08 ml/g por debajo de 3 nm (límite de la porosimetría de Hg).

II.2.7. Adsorción de N_2

En la Figura 9 se muestran las isothermas de adsorción/desorción de las muestras. La forma de las isothermas corresponde al tipo IV de acuerdo con la clasificación BDDT (Apéndice B).⁸³ En el recuadro interior de la Figura 9 se muestran las distribuciones de tamaño de poro, calculadas mediante el método BJH.⁸⁴ En la Tabla VIII se incluyen los valores correspondientes de S_{BET} ,⁸⁵ volumen de poro y máximo en la distribución de tamaño de poros. A medida que aumenta el contenido en P_2O_5 en los vidrios, aumenta el área superficial específica, mientras que disminuye el volumen de poro y el máximo en la distribución de tamaño de poro se desplaza a valores más bajos. Así, al pasar de **S75** a **S70P5** aumenta el área superficial de 133 a 327 m^2/g , disminuye el volumen de poro de 0.52 a 0.43 ml/g , y el diámetro máximo en la distribución de tamaño de poro disminuye de 10.7 a 4 nm .⁷⁹

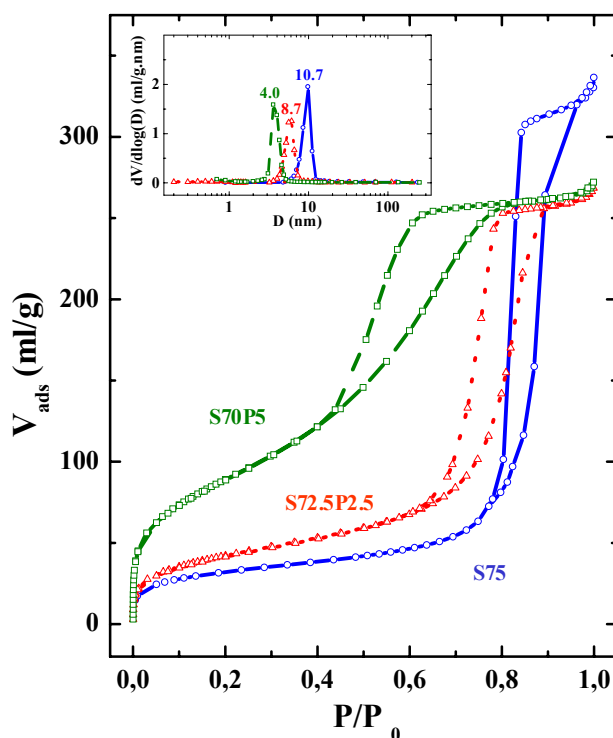


Figura 9: Isothermas de adsorción de N_2 de los vidrios sol-gel. Recuadro interior: Distribuciones de tamaño de poro (método BJH).
 —○— S75, —△— S72.5P2.5, —□— S70P5

II.3. Efecto del P₂O₅ en los vidrios

La composición nominal en óxidos de los vidrios, mostrada en la Tabla VI, se confirmó por FRX. Del mismo modo, el análisis termogravimétrico, ATG, de los geles secos, Figura 4, permitió verificar que las tres composiciones contienen la misma cantidad de CaO, ya que el porcentaje de masa perdida desde temperatura ambiente hasta 700°C es el mismo. Dado que Ca(NO₃)₂·4H₂O es el precursor de CaO en los vidrios, cuando los geles secos se calientan a 700°C para obtener los vidrios, por cada ion Ca²⁺ en la red vítrea se elimina un grupo NO₃⁻. En efecto, al normalizar al 100 % la pérdida de peso entre 140°C y 700°C, promediada en un 25%, se convierte en un 32%, lo que concuerda bien con el valor calculado para la eliminación total de nitratos. Las diferencias apreciadas entre la forma de las tres curvas ATG, Figura 4, indican que el mecanismo para la eliminación de nitratos podría ser diferente para cada composición de vidrio.⁷⁹

II.3.1. Formación de núcleos cristalinos de fosfato de calcio

Los estudios DRX e IRTF de los vidrios, Figuras 5 y 6, sugieren el enlace entre fósforo y calcio en los vidrios que contienen fósforo. Así, los difractogramas de DRX de los vidrios **S72.5P2.5** y **S70P5** presentan la banda difusa a 32° en 2θ, la cual puede atribuirse a la presencia de pequeños cristales con estructura tipo apatita. Esta suposición está en concordancia con la presencia del doblete a 565-597 cm⁻¹ en los espectros IRTF, incipiente para **S72.P2.5** y claramente definido para **S70P5**, característico de los fosfatos cristalinos.^{81,82} Sin embargo, en el caso de **S75**, el vidrio que no contiene fósforo, no se detectó la banda a 32° en el difractograma DRX ni el doblete en el espectro IRTF.

II.3.2. Variación de la superficie específica y porosidad

Los tres vidrios estudiados se sometieron a idénticos tratamientos térmicos durante el proceso de síntesis sol-gel. Por otra parte, todos contienen la misma cantidad de CaO. Por lo tanto, deberían esperarse propiedades texturales similares para todos ellos. Sin embargo, se observaron marcadas diferencias para los tres vidrios, como se muestra en las Figuras 8 y 9 y en la Tabla VIII, que sólo se pueden atribuir al diferente contenido en P₂O₅.

Como se ha dicho, la forma de las isotermas de nitrógeno, Figura 9, corresponde al tipo IV según la clasificación BDDT.⁸³ En todos los casos pudo observarse el ciclo de histéresis característico, lo que evidenció la presencia de mesoporos en los vidrios. Sin embargo, existen diferencias apreciables en la forma de las isotermas. El punto de cierre de la isoterma, es decir la presión parcial a la cual la rama de desorción se une a la de adsorción, se desplaza a valores más bajos a medida que disminuye el contenido en fósforo de los vidrios. Este comportamiento se reflejó en una disminución del tamaño medio de poro de 10.7 nm a 4.0 nm, determinado a partir de la rama de desorción de la isoterma, Figura 9.

Además, existe un cambio claro en la forma del ciclo de histéresis en función del contenido en fósforo. En ausencia de fósforo, la curva sugiere la presencia de poros prácticamente cilíndricos. A medida que el fósforo se incorpora en la matriz del vidrio se obtiene una rama de adsorción más suave, mientras que la rama de desorción cierra más abruptamente el ciclo de histéresis. Dicho comportamiento indica que los poros cilíndricos se transforman progresivamente en lo que puede ser descrito como un poro

con forma de “tintero”, es decir, un poro con un cuerpo principal grande accesible a través de una boca de poro más estrecha.

Los estudios de porosimetría de intrusión de mercurio muestran alrededor de un 57% de porosidad para **S75** y **S72.5P2.5** (Tabla VIII) y de un 44.1% para **S70P5**. Sin embargo, para este último, el valor de porosidad está subestimado ya que se observó un volumen de poro de 0.8 ml/g por adsorción de nitrógeno por debajo de 3 nm, el límite de medida de la porosimetría de intrusión de mercurio. Se detecta una disminución del volumen total de poro a medida que aumenta la cantidad de fósforo en las muestras. Además, el máximo en la distribución de tamaño de poro se desplaza a valores más bajos, de 9.9 hasta 3.6 nm, a medida que la cantidad de fósforo en los vidrios aumenta de 0 a 5 %-mol.

El estudio de adsorción de nitrógeno confirma estas tendencias en lo que se refiere a la disminución del volumen de poro y el diámetro de poro de las muestras a medida que aumenta el contenido de fósforo en los vidrios, Tabla VIII. Sin embargo, los valores de superficie específica, S_{BET} , muestran la tendencia opuesta, siendo 133 m²/g para **S75** y 327 m²/g para **S70P5**. Todas estas variaciones se recogen en la Figura 10, donde se representan los valores de diámetro de poro, volumen de poro y S_{BET} . Así, la presencia de P₂O₅ induce la aparición de núcleos de fosfato de calcio, lo que tiene un efecto en las propiedades superficiales, haciéndolas similares a las de vidrios con menor contenido en calcio.

La Figura 10 muestra las variaciones de las propiedades texturales, volumen de poro, diámetro de poro y S_{BET} , de estos vidrios sol-gel con el contenido en P₂O₅.⁷⁹

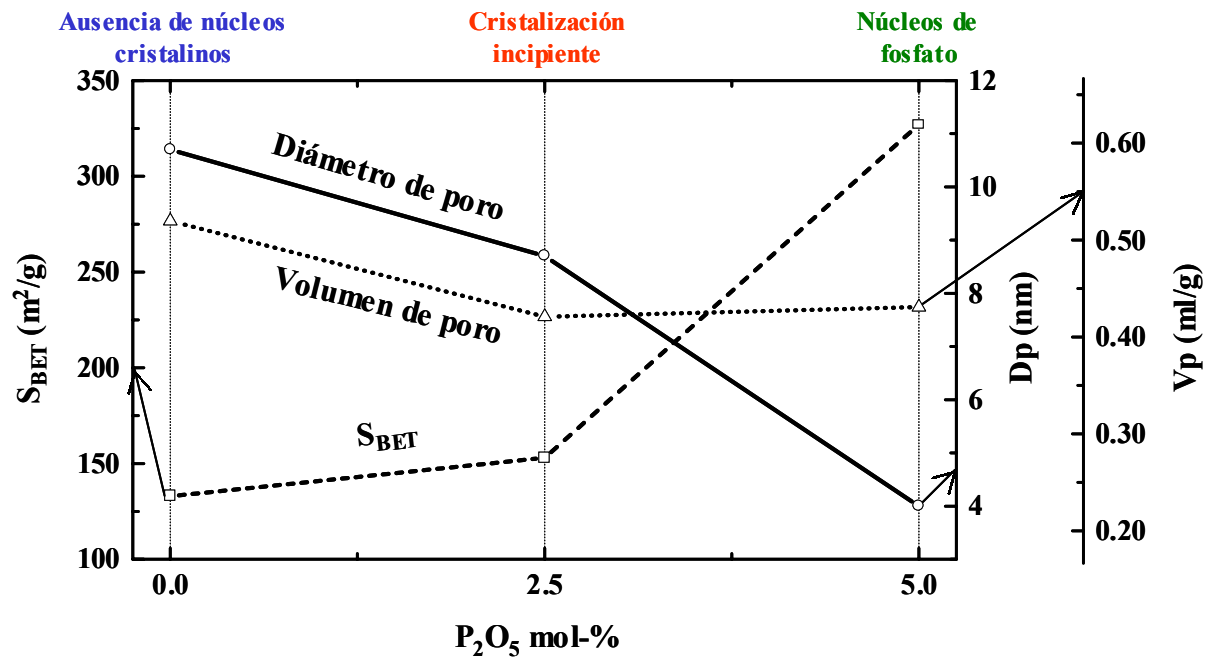


Figura 10: Variaciones del diámetro de poro, volumen de poro y S_{BET} en función del contenido en P_2O_5 en los vidrios sol-gel.

Capítulo III: Estudios *in vitro* de vidrios sol-gel

III.1. Bioactividad

III.1.1. SBF estático

III.1.1.a. Protocolo SBF estático

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo sumergiendo las muestras en 40 ml de SBF a 37°C durante intervalos desde 1.5 h a 7 días. El SBF es una disolución acuosa acelular con una composición iónica prácticamente igual a la del plasma humano: Na⁺: 142, K⁺: 5.0, Mg²⁺: 1.5, Ca²⁺: 2.5, Cl⁻: 147.8, HCO₃⁻: 4.2, HPO₄²⁻: 1.0 y SO₄²⁻: 0.5 mM, tamponado a 7.30 con tris(hidroximetil) aminometano/HCl. Para evitar efectos como consecuencia de las diferencias de volumen se empleó una relación área de las piezas/volumen de SBF de 0.075 cm⁻¹. Tras los ensayos, las piezas de vidrio se retiraron del SBF, se aclararon ligeramente en agua y acetona y se dejaron secar al aire. Para evitar la contaminación por microorganismos de la capa, todas las manipulaciones se efectuaron dentro de una cabina de flujo laminar (Telstar AV-100) y previo a los ensayos, se filtró el SBF con un sistema Millipore[®] de 0.22 μm.

Los valores de concentración de Ca²⁺ y de pH en la disolución se determinaron mediante medidas de electrodos selectivos a iones, utilizando un sistema ILyte[®] de Na⁺, K⁺, Ca²⁺, pH. Las concentraciones de fósforo y silicio se midieron mediante formación de complejos y espectroscopia UV-visible en un espectrofotómetro Unicam UV 500. Los cambios en la superficie de los vidrios con el tiempo de inmersión se siguieron a través de DRX, IRTF y MEB-EDX.⁷⁹

III.1.1.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución

En la Figura 11 se muestran las gráficas que representan los cambios en los valores de pH y de las concentraciones de Ca (II) P (V) y Si (IV) en disolución con el tiempo de inmersión. Los valores representados son la media aritmética calculada para dos muestras independientes. En la Figura se indican los valores de la desviación estándar de cada punto.

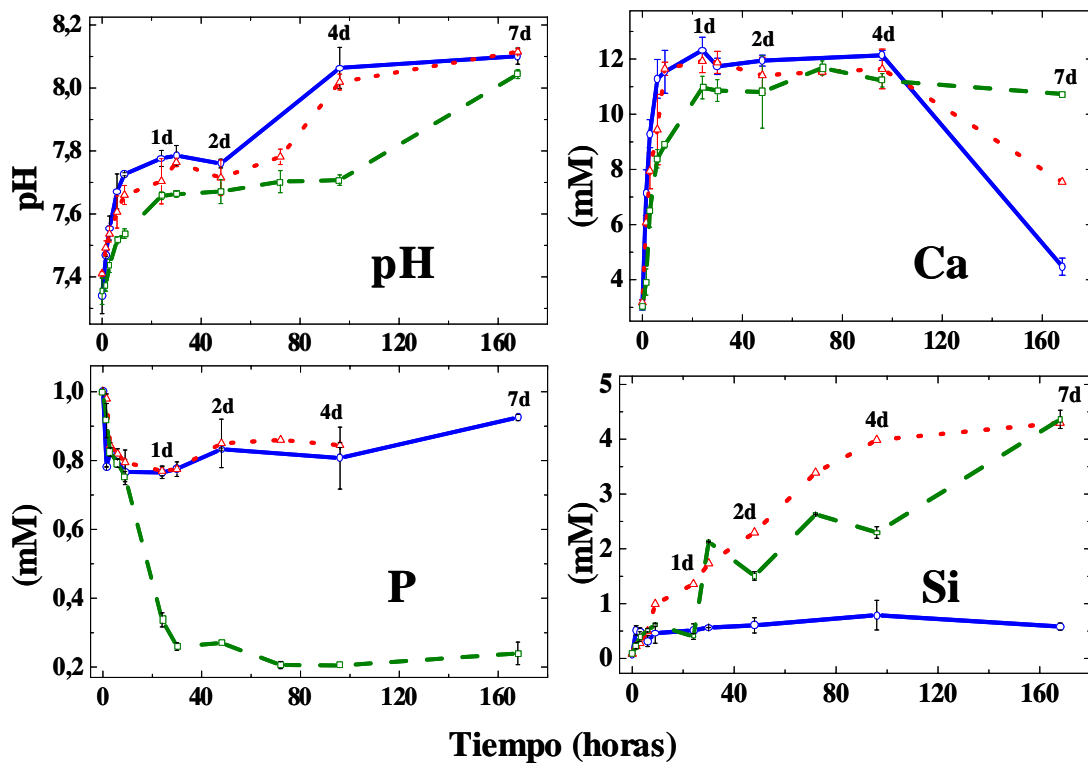


Figura 11: Variaciones en las concentraciones iónicas en el SBF con el tiempo de ensayo.
 —○— S75, —△— S72.5P2.5, —□— S70P5

Durante las primeras 6 horas de ensayo, se detectó un marcado incremento del pH y de la concentración de Ca^{2+} . Sin embargo, se observaron algunas diferencias en función de la composición de los vidrios. Así, tras 6 horas de inmersión, la concentración de Ca^{2+} en la disolución fue 11.3, 10.0 y 8.4 mM, mientras que el pH fue 7.7, 7.6 y 7.5 para S75, S72.5P2.5 y S70P5, respectivamente. Sin embargo, tras 24 horas, la concentración de Ca^{2+} alcanzó en todos los casos valores entorno a 11-12 mM.

Esos valores se mantuvieron constantes durante 7 días para **S70P5**. Sin embargo, para **S72.5P2.5** y **S75** se detectó una disminución del Ca^{2+} en disolución para tiempos de ensayo superiores a 4 días. Por otra parte, para todas las composiciones, el valor de pH siguió aumentando a lo largo de todo el experimento hasta valores cercanos a 8.1 tras 7 días en SBF.

Por lo que respecta a la concentración de P (V) en disolución, en las primeras 9 horas, se observó una disminución desde 1 mM, el valor inicial del SBF, hasta alrededor de 0.8 mM para los tres vidrios. Posteriormente, la concentración en SBF permaneció prácticamente constante para **S75** y **S72.5P2.5** mientras que para **S70P5** se observó una repentina disminución hasta 0.3 mM, a partir de las 24 horas, que se atribuyó a la precipitación en volumen de la apatita en el conjunto de la disolución durante el almacenamiento previo a la medida de fósforo.

En la Figura 11 se muestra asimismo la evolución de la concentración de Si (IV) con el tiempo. Durante las 9 primeras horas, la liberación de Si (IV) fue similar para las 3 composiciones. Para tiempos mayores, la cantidad de Si (IV) en disolución permanece casi constante en torno a 0.5 mM durante 7 días para **S75**. Mientras que para **S72.5P2.5** y **S70P5** continúa aumentando hasta 4 mM tras 7 días de inmersión.⁷⁹

III.1.1.c. Estudio de la superficie de los vidrios

Tras la inmersión en SBF, la evolución de la superficie de los vidrios se siguió mediante DRX, IRTF y MEB-EDX.⁷⁹

III.1.1.c.1. DRX

La Figura 12 muestra los difractogramas de DRX de **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5** tras 0, 2, 4 y 7 días de ensayo. Después de 2 días, no es posible apreciar ningún cambio en comparación con los difractogramas iniciales. Sin embargo, tras 4 días, se detecta la aparición de una banda difusa centrada a 26° en 2θ en los difractogramas de **S72.5P2.5** y **S70P5**, que puede asignarse a la reflexión (002) de una fase tipo apatita.⁸⁰ Además, se observa una banda difusa a 32° para **S75** y un incremento en la intensidad de la banda a 32° para los vidrios **S72.5P2.5** y **S70P5** que se había asignado a la reflexión (211) de una fase tipo apatita.⁸⁰ Tras 7 días, los difractogramas pueden asignarse a una fase tipo apatita con pequeño tamaño de cristal. La amplia banda entre 20 y 30° , presente en los materiales iniciales (a tiempo 0) de carácter amorfo, decrece con el tiempo de inmersión pero sólo desaparece para **S70P5** tras 7 días de inmersión.⁷⁹

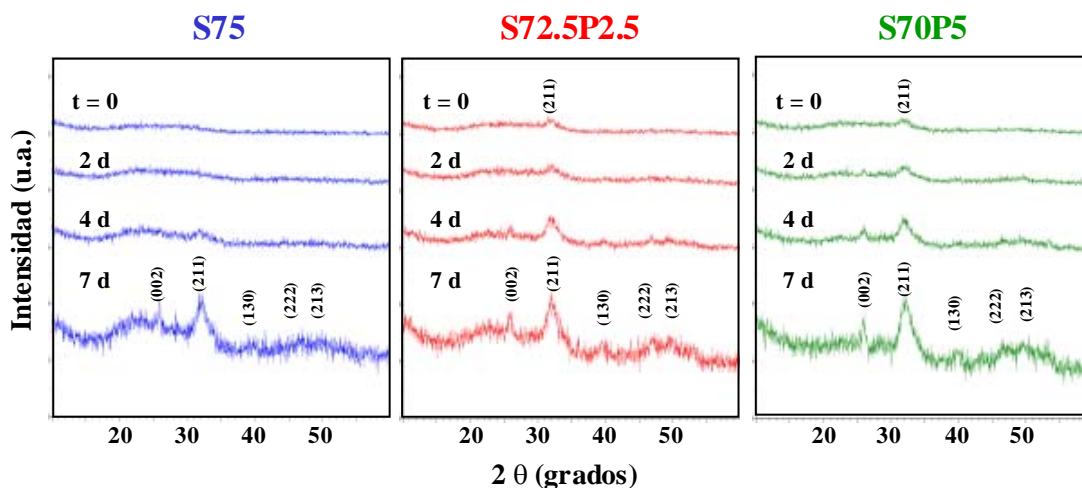


Figura 12: Difractogramas de rayos-X de los vidrios antes y tras su inmersión en SBF durante diferentes intervalos de tiempo.

III.1.1.c.2. IRTF

Los espectros IRTF de los vidrios sol-gel antes y después de su inmersión en SBF durante varios intervalos de tiempo se muestran en la Figura 13. Tras 1.5 horas en SBF, una nueva banda de fosfato amorfo a 562 cm^{-1} se observa en el espectro de **S75**. Además, el doblete a $565\text{-}597\text{ cm}^{-1}$, visible en los espectros de los vidrios **S72.5P2.5** y **S70P5**, se va convirtiendo en un singlete. Para todas las composiciones, puede apreciarse el ensanchamiento de la banda de silicato a 1090 cm^{-1} , posiblemente debido a su solapamiento con la banda de fosfato a 1035 cm^{-1} . Del mismo modo, están presentes dos bandas a 1394 y 865 cm^{-1} , que pueden asignarse a grupos carbonato.^{81,82}

Tras 6 horas, los espectros de IRTF de **S75** y **S70P5** son muy similares a los obtenidos tras 1.5 horas de inmersión. Sin embargo, en el espectro de **S75.5P2.5**, se observa un ensanchamiento adicional de la banda a 1090 cm^{-1} y el cambio del doblete a $565\text{-}597\text{ cm}^{-1}$ en un singlete a 565 cm^{-1} , típico de fosfato amorfo.^{81,82}

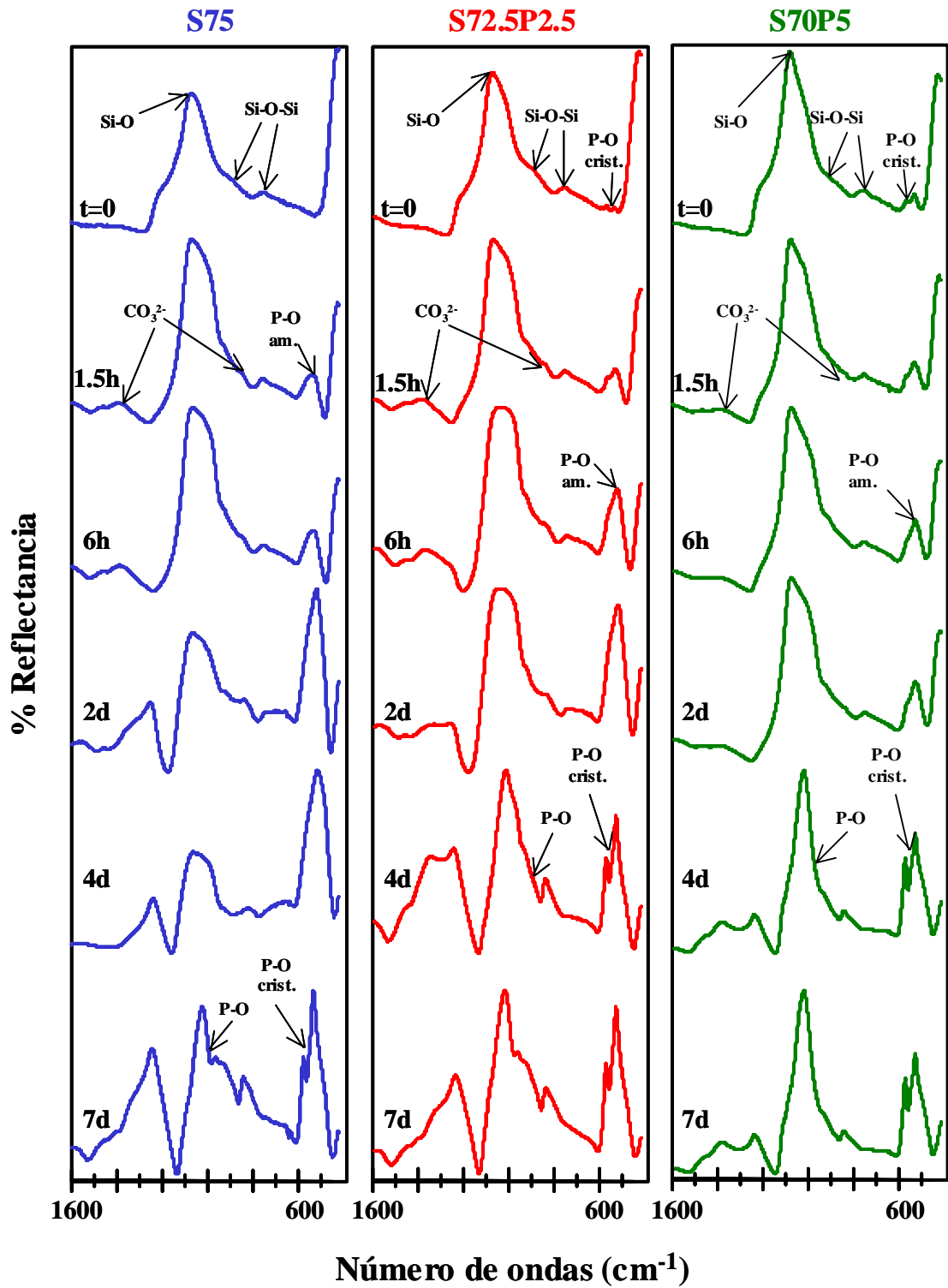


Figura 13: Espectros IRTF de los tres vidrios sol-gel antes y tras su inmersión en SBF durante diferentes intervalos de tiempo.

Después de 2 días de ensayo, la magnitud de la banda a 560 cm^{-1} aumenta significativamente para **S75** y **S72.5P2.5**. Por otro lado, no se observan modificaciones para **S70P5**.^{81,82}

Tras 4 días de inmersión, el espectro IRTF de **S75** permanece inalterado. Sin embargo, los espectros de **S72.5P2.5** y **S70P5** son similares a los obtenidos para una carbonato hidroxiapatita, exhibiendo bandas de fosfato a 1035 y $565\text{-}597\text{ cm}^{-1}$ y bandas de carbonato a 1394 y 865 cm^{-1} . Tras 7 días en SBF, los espectros de IRTF de los 3 vidrios son análogos al espectro de la apatita del hueso.^{79,81,82}

III.1.1.c.3. MEB-EDX

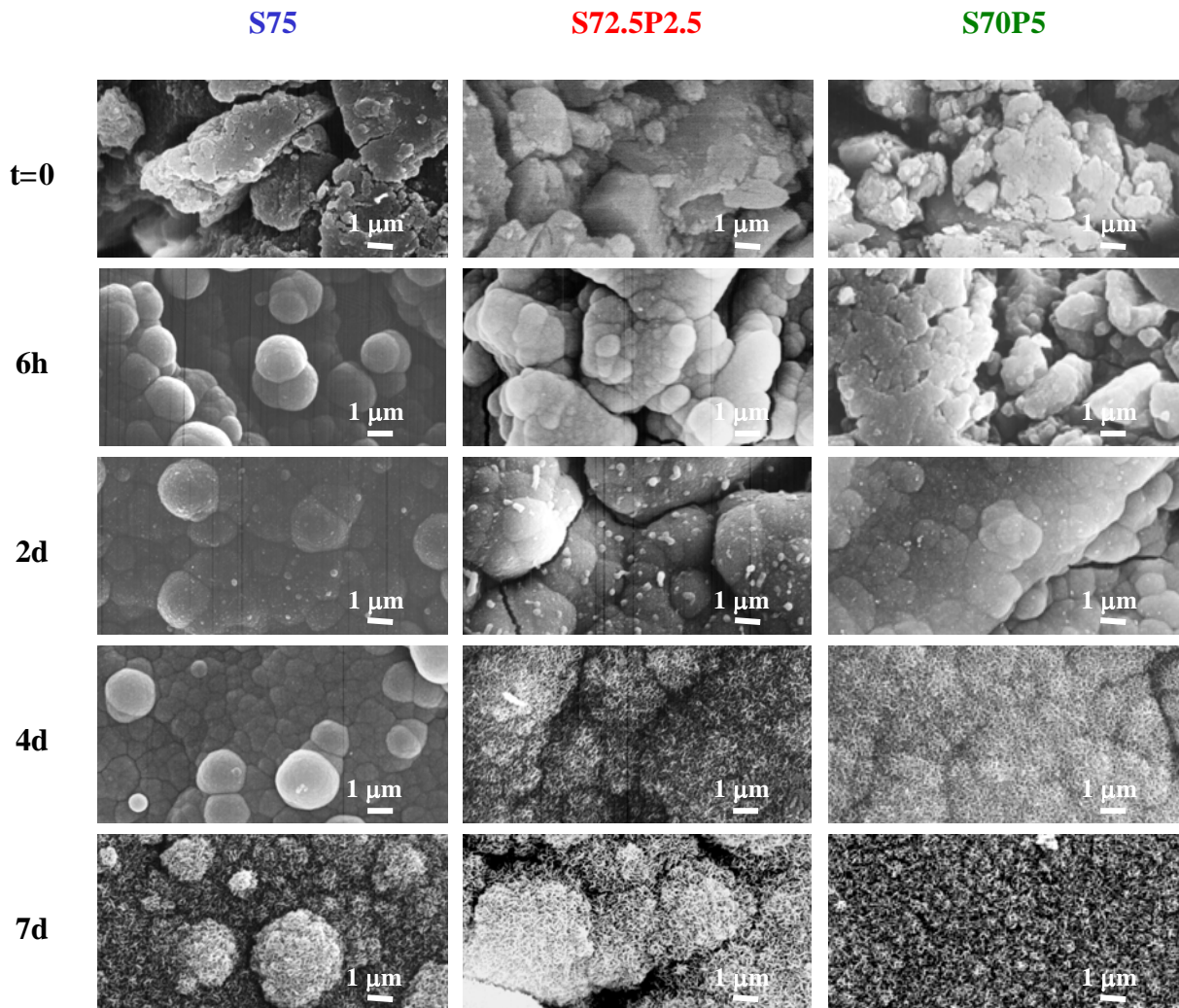


Figura 14: Micrografías MEB de los vidrios sol-gel antes y tras diferentes tiempos de ensayo.

La Figura 14 muestra las imágenes MEB de las superficies de **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5** tras diferentes intervalos de inmersión. Tras 6 horas, aparece una capa de esferas cubriendo la superficie de **S75**. Esta evolución es incipiente para **S72.5P2.5** y retardada para **S70P5**. Tras 2 días, todos los vidrios se cubrieron completamente de una capa recién formada. En las micrografías de **S72.5P2.5** y **S70P5**, se pueden ver pequeñas partículas, atribuibles a núcleos de cristalización. Tras 4 días, para las muestras **S72.5P2.5** y **S70P5**, las esferas lisas se transforman en aglomerados pseudoesféricos de

partículas con forma de copo. Tras 7 días de inmersión, una capa de estas partículas cubre los tres vidrios.⁷⁹

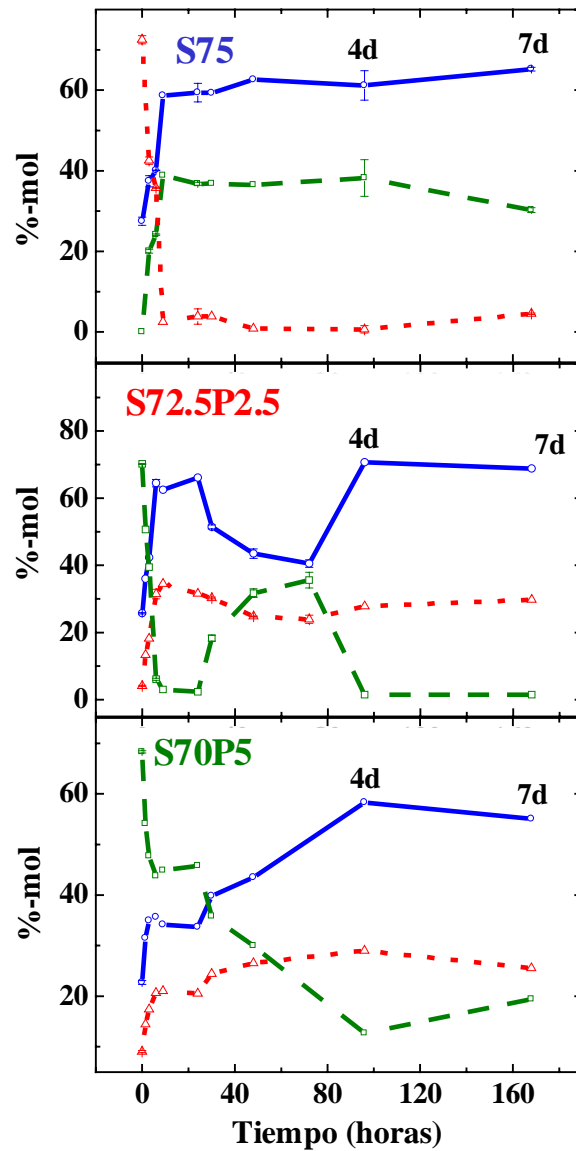


Figura 15: Variaciones en el contenido en Ca, Si y P de la superficie de los vidrios con el tiempo de ensayo determinadas mediante EDX.

—○— Ca, -△- Si, -□- P

En la Figura 15, se muestra la evolución con el tiempo de la composición de la superficie de los vidrios, a partir de los resultados de EDX. La evolución de **S75** y **S72.5P2.5** es muy similar, y tras 9 horas de ensayo, sólo se detecta calcio y fósforo en la capa. Sin embargo, el recubrimiento de **S70P5** por la capa lleva más tiempo pues se requieren 4 días de inmersión para detectar calcio y fósforo como elementos predominantes en la superficie de la muestra. Para tiempos inferiores a 4 días, se detectaron apreciables cantidades de silicio en la superficie de este vidrio.⁷⁹

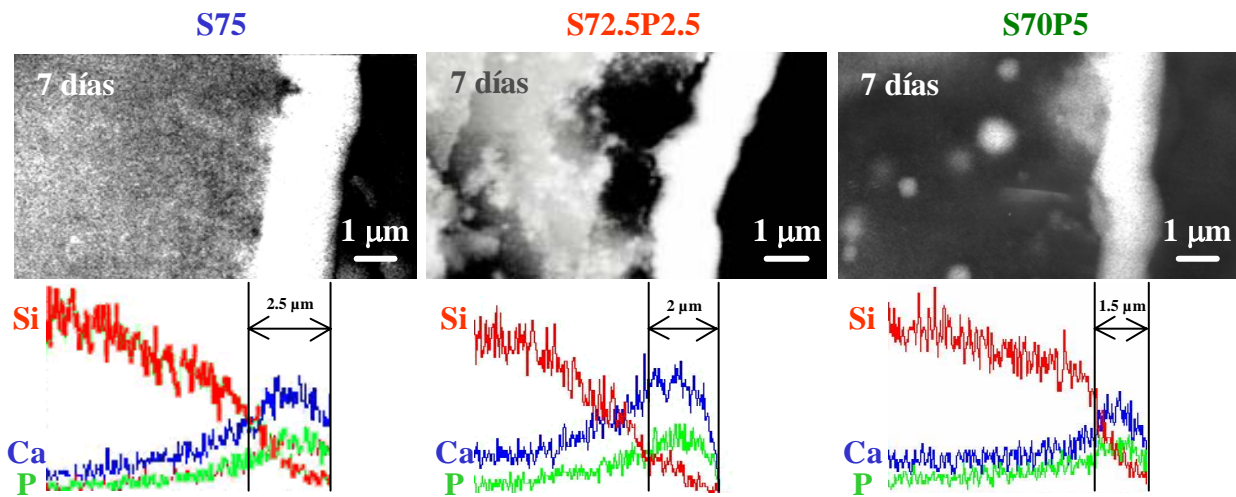


Figura 16: Micrografías MEB obtenidas con electrones retrodispersados de las secciones transversales de los vidrios sol-gel tras 7 días en SBF. Se incluyen las distribuciones a lo largo del perfil de los elementos Si, Ca y P.

La Figura 16, muestra las micrografías MEB de las secciones transversales, obtenidas mediante electrones retrodispersados, y la distribución de elementos a lo largo de las secciones transversales de los vidrios tras 7 días en SBF. Para **S70P5**, la imagen muestra zonas de contraste claro en la parte interna, que pueden atribuirse al crecimiento interno de esferas. El espesor de la capa de apatita disminuye a medida que aumenta el contenido en fósforo en el vidrio, desde 2.5 µm para **S75** a 1.5 µm para **S70P5**.⁷⁹

III.1.1.d. Comportamiento de los vidrios en SBF estático: Efecto del P_2O_5

Como se ha dicho, uno de los principales objetivos de esta tesis es comparar la bioactividad *in vitro* de tres vidrios sol-gel con igual proporción de CaO y diferentes contenidos de P_2O_5 . Los resultados presentados permiten establecer que:

- **S75** es el vidrio más reactivo en los primeros instantes de inmersión en SBF y presenta la mayor velocidad de formación de la capa de fosfato amorfo: 1.5 h. (Figura 14).
- En los vidrios con fósforo, **S72.5P2.5** y **S70P5**, la cristalización de apatita requiere un intervalo de tiempo más corto (4 días) que en **S75** (7 días) (Figuras 13 y 14).
- El espesor de la capa de apatita tras 7 días de ensayo disminuye desde 2.5 μm hasta 1.5 μm al aumentar el contenido en P_2O_5 de los vidrios (Figura 16).

Las diferencias en la formación de la capa de apatita entre los tres vidrios se presentan de forma esquemática en la Figura 17. Como se observa, a medida que aumenta el contenido en P_2O_5 de los vidrios, la formación del fosfato amorfo tiene lugar más lentamente, aunque se favorece la cristalización de apatita, según señalan los resultados de IRTF y MEB. Por tanto, la presencia en los vidrios de pequeñas cantidades de P_2O_5 , desde 2.5 a 5%-mol es ventajosa pero no esencial para la bioactividad.⁷⁹

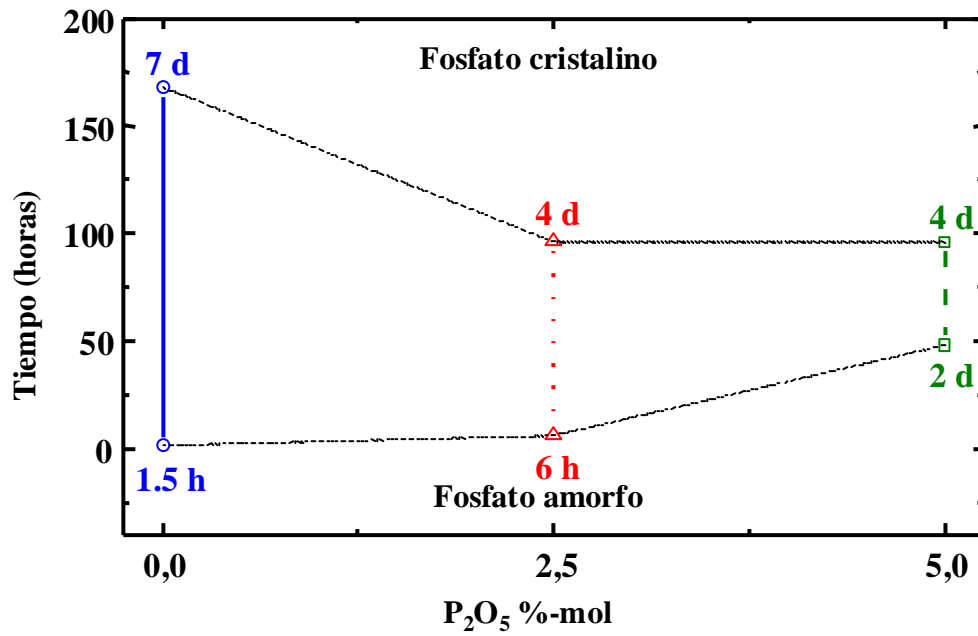


Figura 17: Tiempos necesarios para la formación de la capa de fosfato amorfo en la superficie de cada vidrio y para la cristalización de la apatita en función del contenido en P_2O_5 .

III.1.2. SBF dinámico

III.1.2.a. Protocolo SBF dinámico

La Figura 18 muestra esquemáticamente el dispositivo en el que se realizaron los ensayos *in vitro* en condiciones **dinámicas**. La disolución de ensayo –SBF recién preparado y filtrado– se renovó constantemente con ayuda de una bomba peristáltica. Como los flujos de aporte y retirada de SBF fueron idénticos, el volumen de la solución en el recipiente se mantuvo constante durante todo el ensayo. Basándonos en resultados anteriores de otros miembros de nuestro grupo,⁶¹ el flujo de renovación de la disolución utilizado fue 1 ml/min.⁸⁶

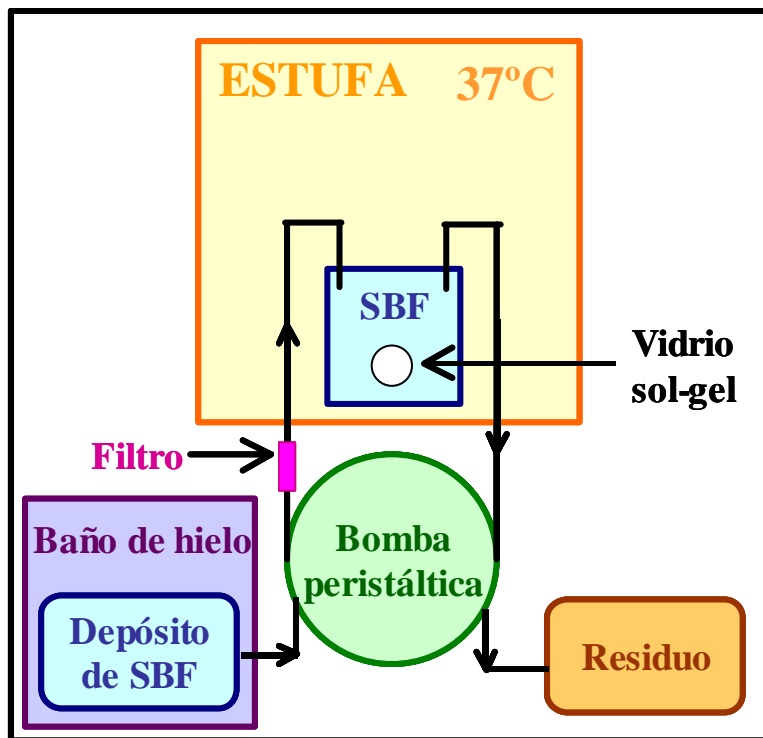


Figura 18: Esquema del ensayo *in vitro* dinámico.

III.1.2.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución

La inmersión de los vidrios en **SBF dinámico** cambió ligeramente la composición de la disolución durante las primeras 3 horas de ensayo (Figura 19) aumentando el valor del pH de 7.37 a 7.40 (para **S75**) 7.47 (para **S72.5P2.5**) y 7.43 (para **S70P5**) el del Ca^{2+} de 2.23 a 4.12 (para **S75**) 3.02 (para **S72.5P2.5**) y 2.65 (para **S70P5**) mM y el del silicio de 0 a 0.15 (para **S75**) 0.11 (para **S72.5P2.5**) y 0.04 (para **S70P5**) mM. Por el contrario, la concentración del fósforo disminuyó de 0.96 a 0.89 mM. Sin embargo, para tiempos de inmersión mayores, estos parámetros recuperaron los valores iniciales de concentración del SBF (próximos a los del plasma humano).⁸⁶

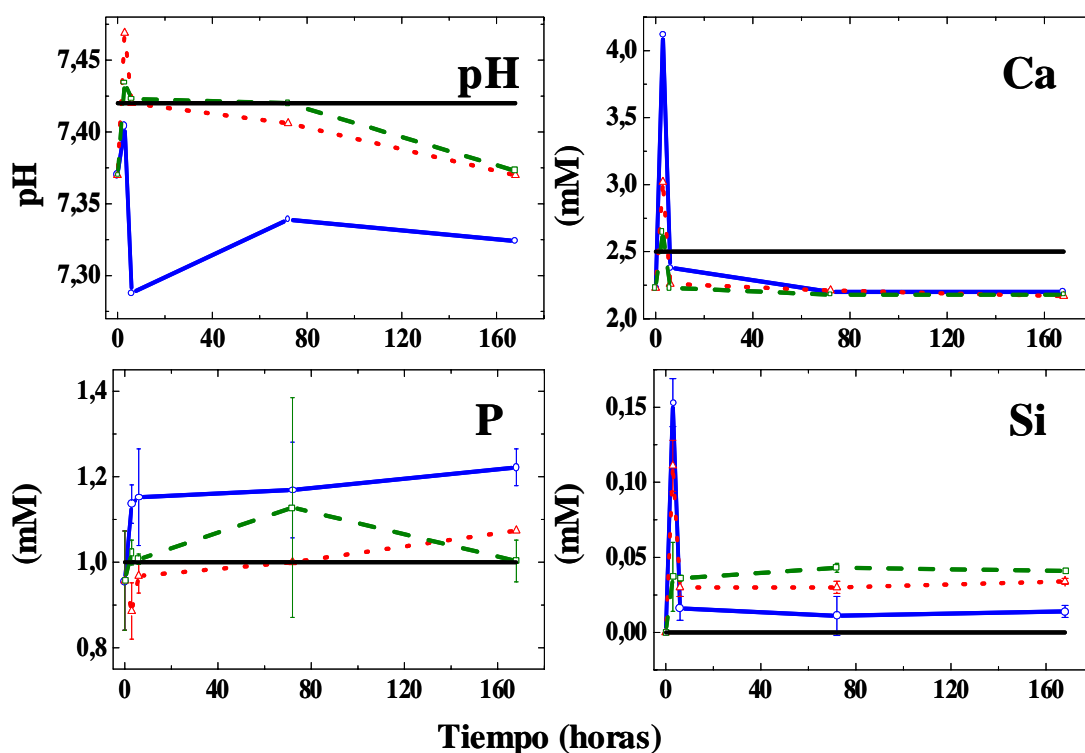


Figura 19: Variaciones en las concentraciones iónicas en el **SBF dinámico** con el tiempo de ensayo en comparación con las concentraciones en el plasma humano.

—○— **S75**, —●— **S72.5P2.5**, —□— **S70P5**, — **Plasma humano**

III.1.2.c. Estudio de la superficie de los vidrios

Las variaciones en la superficie de los vidrios tras diferentes tiempos de ensayo se analizaron mediante DRX, IRTF y MEB-EDX.

III.1.2.c.1. DRX

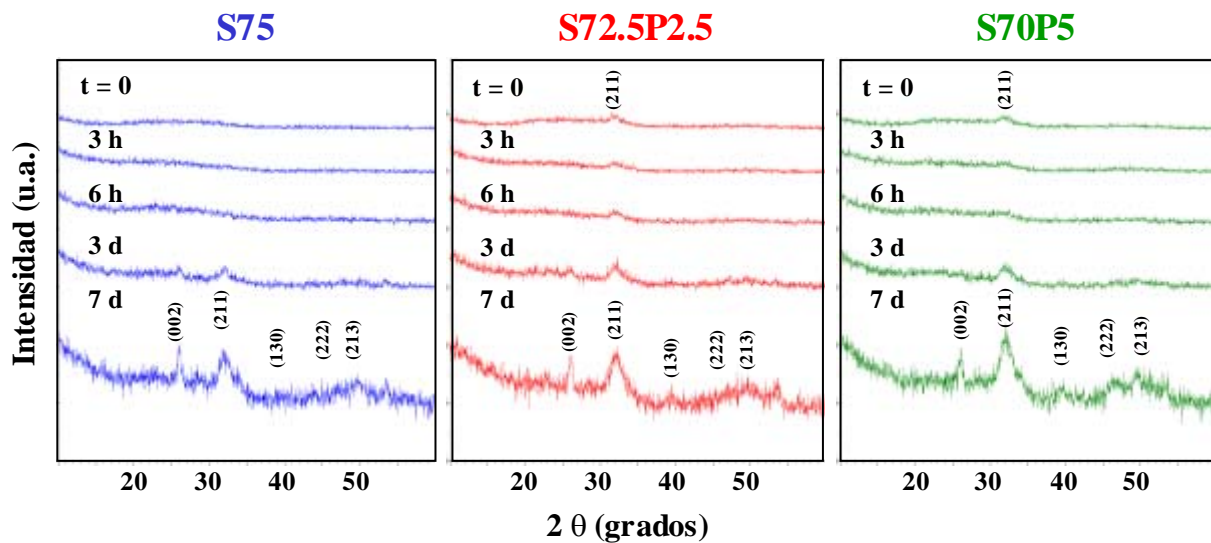


Figura 20: Difractogramas de rayos-X de los vidrios antes y tras su inmersión en **SBF dinámico** durante diferentes intervalos de tiempo.

En la Figura 20 se representan los difractogramas DRX de los vidrios antes y después de diferentes tiempos de inmersión en **SBF dinámico**. Tras 3 días, es posible detectar la aparición de una banda difusa a 26° en 2θ, que podría corresponder a la reflexión (002) y otra a 32° que puede asignarse a la reflexión (211) ambas de una fase tipo apatita.⁸⁰ Tras 7 días, se pueden identificar varias reflexiones anchas y poco definidas, todas ellas asignables a una fase tipo apatita⁸⁰ de pequeño tamaño de cristal.⁸⁶

III.1.2.c.2. IRTF

La Figura 21, muestra la evolución con el tiempo de inmersión en **SBF dinámico** de los espectros de IRTF en reflectancia difusa de los vidrios. A las 3 horas de ensayo, aparecen nuevas bandas que podrían asignarse a fosfato amorfo a 557 cm^{-1} y al grupo carbonato a 1382 y 940 cm^{-1} . A los 7 días de ensayo, aparece una banda a 1040 cm^{-1} y un doblete a $602, 560\text{ cm}^{-1}$, características de un fosfato cristalino.^{81,82,86}

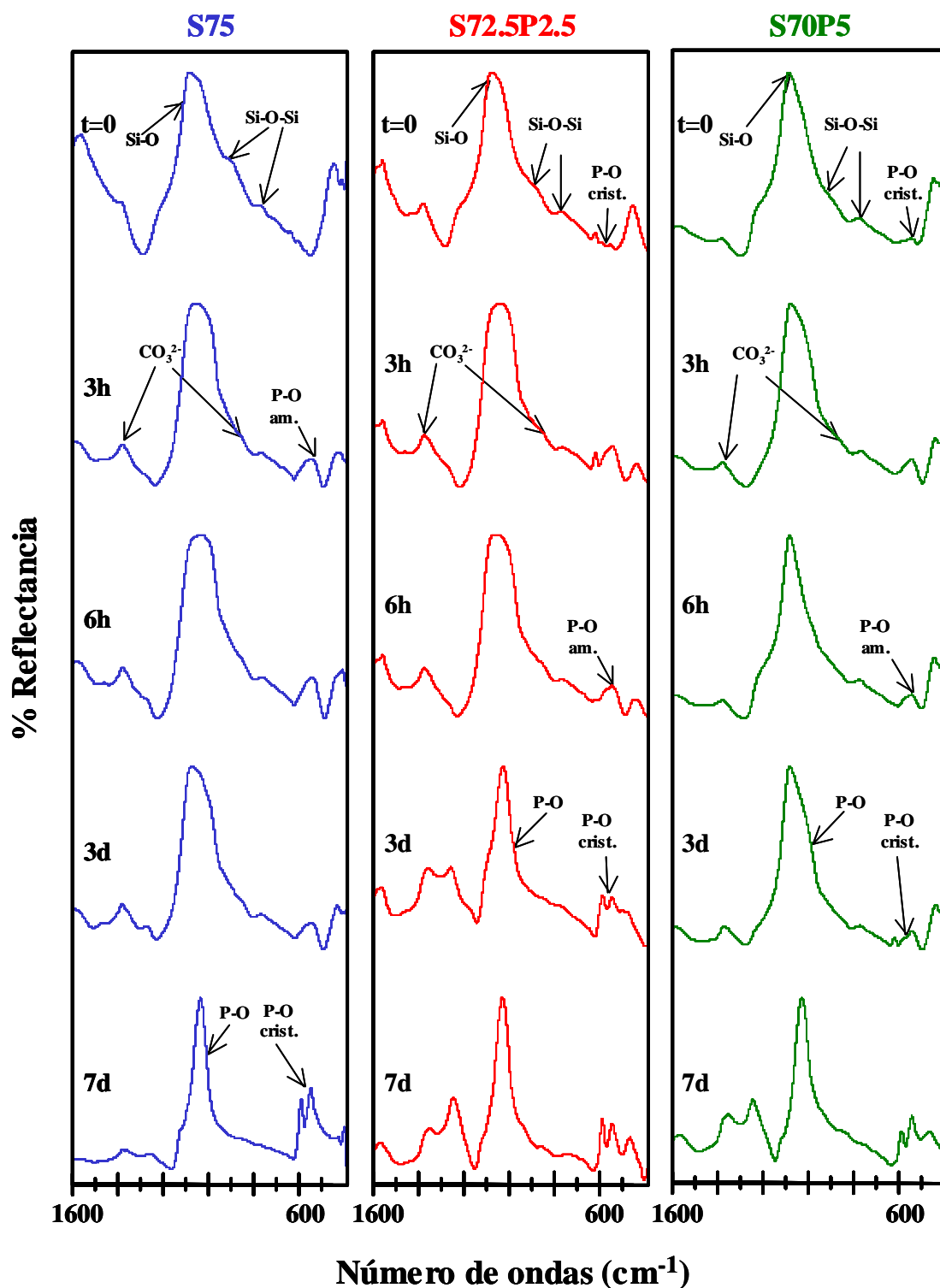


Figura 21: Espectros IRTF de los vidrios sol-gel antes y tras su inmersión en SBF dinámico durante diferentes intervalos de tiempo.

III.1.2.c.3. MEB-EDX

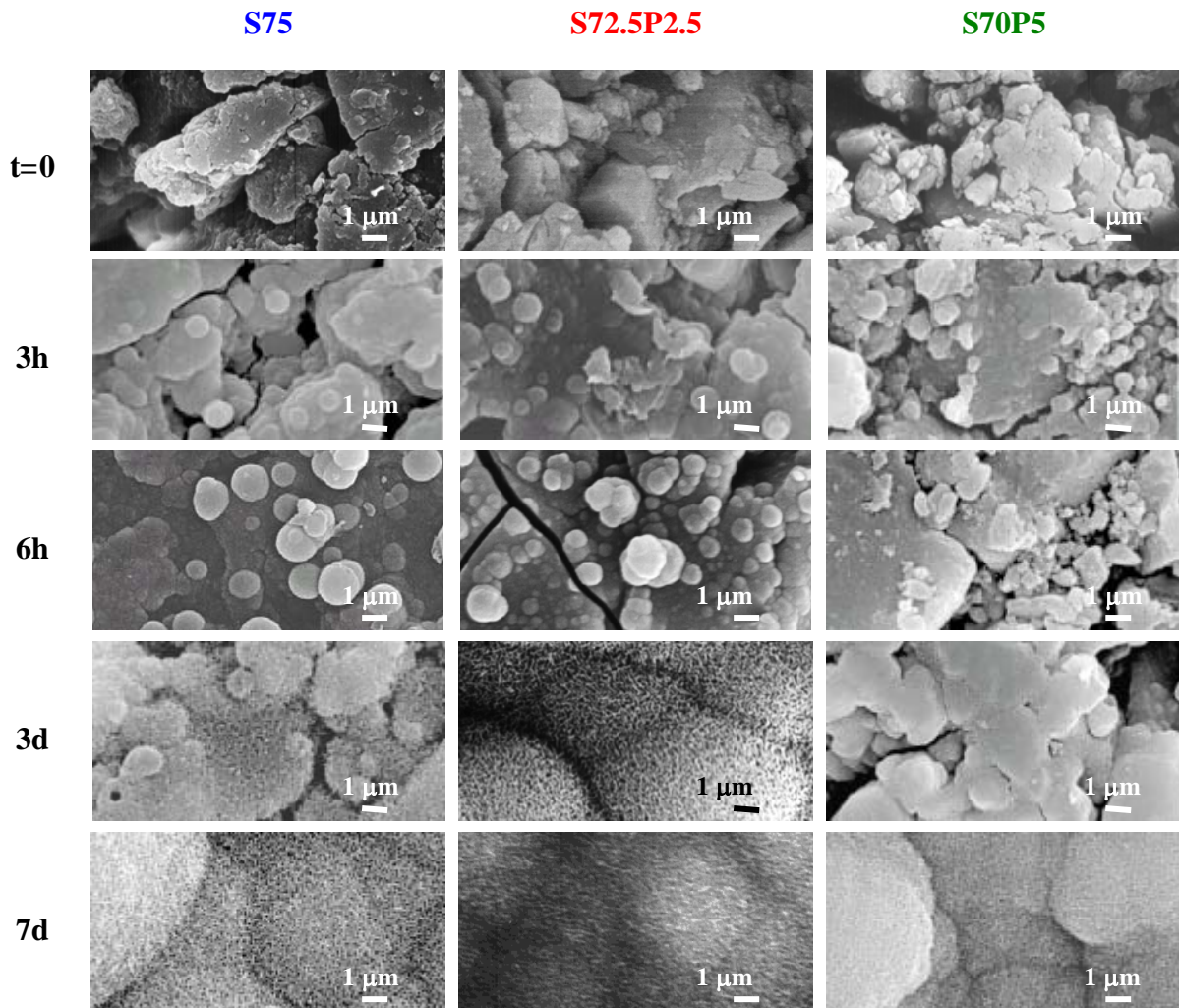


Figura 22: Micrografías MEB de los vidrios sol-gel antes y tras diferentes tiempos de inmersión en **SBF dinámico**.

En la Figura 22 se muestran las micrografías MEB de los vidrios antes y después de su inmersión en **SBF dinámico**. A los 3 días de ensayo, se observa sobre la superficie de **S72.5P2.5** los aglomerados de partículas característicos de apatita cristalina. Sin embargo, para **S75** y **S70P5** no se observa la aparición de dichos aglomerados hasta los 7 días de ensayo. A los 7 días, la situación es análoga para los

tres vidrios, pero puede observarse una velocidad de formación de la capa diferente en función de la composición del vidrio.⁸⁶

Las variaciones en las composiciones de silicio, calcio y fósforo en la superficie de los vidrios con el tiempo de ensayo en **SBF dinámico** determinadas mediante EDX están representadas en la Figura 23. Como puede observarse la cantidad de silicio disminuye mientras que las de calcio y fósforo aumentan con el tiempo de ensayo hasta alcanzar una relación de Ca/P más cercana a 1.67 (la de la apatita del hueso) que en **SBF estático** (Tabla IX).⁸⁶

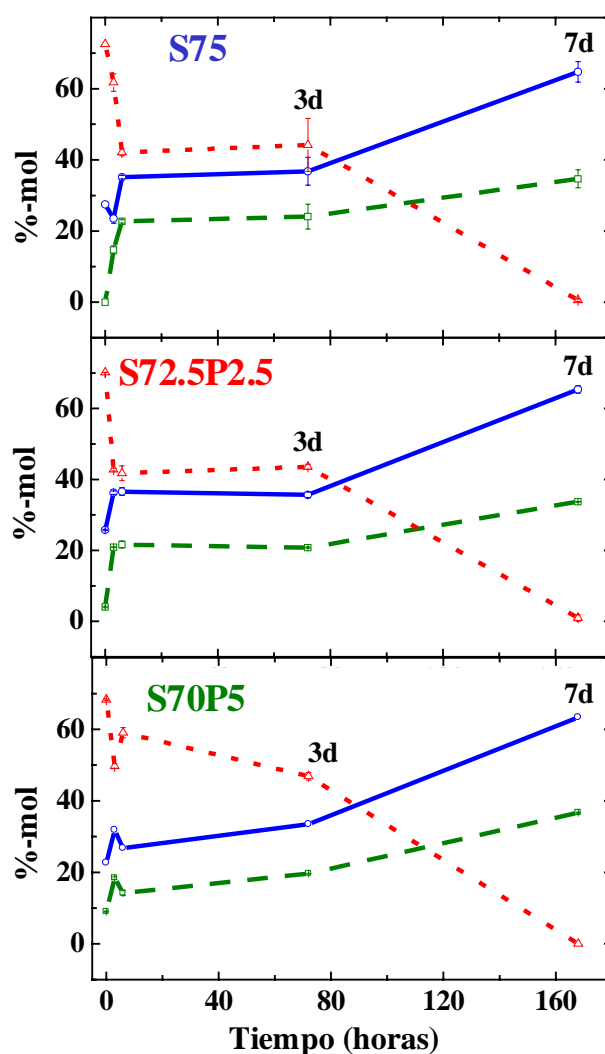


Figura 23: Variaciones en el contenido en Ca, Si y P de la superficie de los vidrios con el tiempo de ensayo en **SBF dinámico** determinadas por EDX.

—○— Ca,△..... Si, ---□--- P

La Figura 24, muestra las micrografías MEB de las secciones transversales, obtenidas mediante electrones retrodispersados, y la distribución de elementos a lo largo del perfil de los vidrios tras 7 días en **SBF dinámico**. Los espesores de la capa de apatita depositada sobre la superficie de los vidrios son mucho mayores que en **SBF estático** (Figuras 16 y 24, así como la Tabla IX).⁸⁶

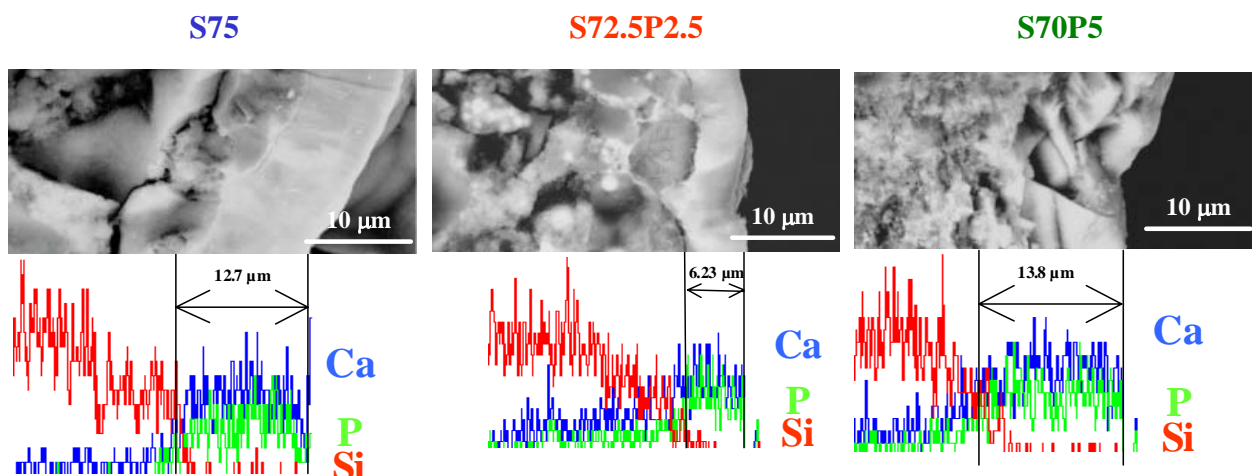


Figura 24: Micrografías MEB obtenidas con electrones retrodispersados de las secciones transversales de los vidrios sol-gel tras 7 días en **SBF dinámico**. Se incluyen las distribuciones a lo largo del perfil de los elementos Si, Ca y P.

III.1.2.d. Comportamiento de los vidrios en SBF dinámico

Los resultados que aparecen en la Figura 19 demuestran que en **dinámico** y renovando la solución con un flujo de 1 ml/min, las concentraciones iónicas y el pH durante el ensayo fueron más similares a las del plasma humano que cuando el ensayo se llevó a cabo en **SBF estático** (Figura 11).

El aumento inicial de la concentración de Ca^{2+} en disolución durante el ensayo en **dinámico** podría haber ocurrido porque el flujo de renovación del SBF no fue lo bastante elevado como para compensar la liberación de Ca^{2+} del vidrio.

En los vidrios bioactivos la liberación de Ca^{2+} a la disolución tiene lugar a través de un intercambio de protones con el medio,^{12,86} que conlleva un incremento del pH. Por tanto, el ligero incremento del pH podría haber sucedido por razones análogas a las de la variación de la concentración de Ca^{2+} .

El análisis EDX de los vidrios tras los ensayos *in vitro* mostró la influencia del protocolo en la composición de la capa formada. Así, en **estático** se detectó silicio lo que puede deberse a la incorporación a la capa de parte del Si (IV) liberado por el vidrio. También podría tratarse de silicio del propio sustrato, lo que indicaría que la capa es de pequeño espesor o que presenta discontinuidades. Sin embargo, en **dinámico** no se detectó silicio, lo que se ha justificado considerando tanto la eliminación de este elemento en la renovación de la solución, como el mayor espesor de la capa tipo apatita (Figura 24) que impediría al haz de electrones penetrar hasta el sustrato.

La relación Ca/P a los 7 días en la superficie del vidrio determinada por EDX fue inferior en **dinámico** que en **estático** y más próxima a 1.67 (la de la apatita del hueso) (Figuras 15 y 23 y Tabla IX).

En **dinámico** el calcio y el fósforo se están renovando continuamente, mientras que en **estático** las cantidades de calcio y fósforo en disolución son fijas y pueden llegar a agotarse cuando se forma la capa apatita. Por ello, en **dinámico** la capa puede llegar a tener mayor espesor que en **estático** (Figuras 16 y 24 y Tabla IX).⁸⁶

La Tabla IX compara los resultados de tiempo de cristalización, espesor de la capa CHA y relación Ca/P a los 7 días de ensayo **estático** y **dinámico**.⁸⁶

Tabla IX: Comparación entre el tiempo de cristalización de la capa de apatita, el espesor de dicha capa y la relación Ca/P en la misma a los 7 días de ensayo en **SBF estático** y **dinámico**.

Vidrio	Sistema	Tiempo de cristalización de CHA (días)	Espesor de la capa tras 7 días (μm)	Relación Ca/P tras 7 días
S75	Estático	7	2.5	2.22
	Dinámico	7	12.7	1.87
S72.5P2.5	Estático	4	2	2.31
	Dinámico	3	6.23	1.94
S70P5	Estático	4	1.5	2.15
	Dinámico	7	13.8	1.72

III.1.3. Plasma Inorgánico Simulado Carbonatado (CSIP)

III.1.3.a. Protocolo CSIP

Dada la mayor complejidad de este método, en **CSIP** (Carbonated Simulated Inorganic Plasma) sólo se estudió el vidrio **S72.5P2.5**. Los ensayos se llevaron a cabo sumergiendo las muestras en 40 ml de disolución a 37°C. Este plasma se preparó disolviendo la misma cantidad de reactivos que para preparar SBF convencional y sustituyendo el tampón tris(hidroximetil) aminometano/HCl (TRIS) por el tampón fisiológico $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Para ello, se burbujea la disolución con una mezcla de gases CO_2 y N_2 para que el pH de la disolución se mantenga entre 7.3 y 7.4, ajustando la presión parcial del CO_2 entre 5.0 y 7.2 KPa. Al mismo tiempo, se consigue que la concentración de HCO_3^- en la disolución sea de 24-27 mM. En la Figura 25 se describe esquemáticamente el montaje del ensayo en **CSIP**.^{63,86}

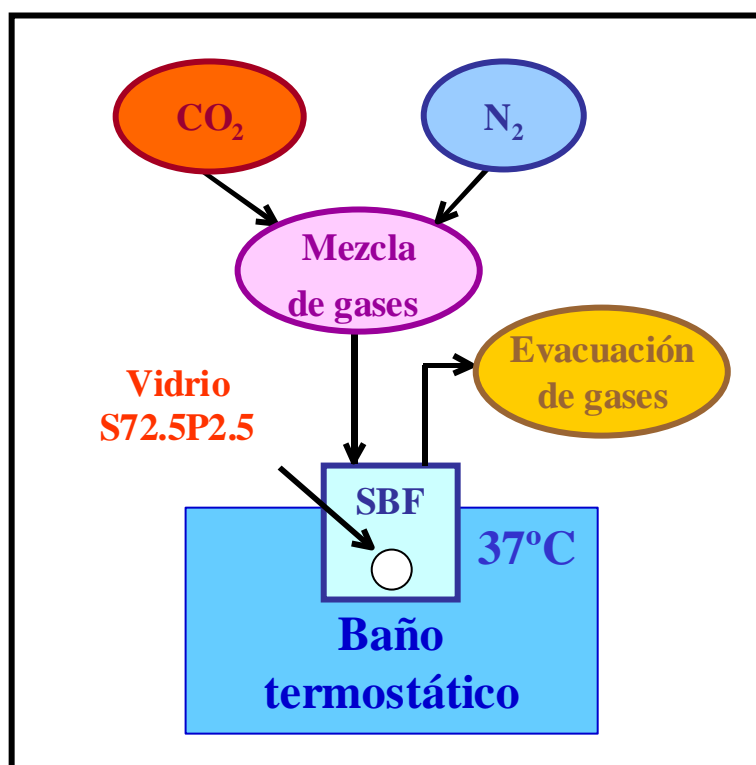


Figura 25: Esquema del ensayo *in vitro* en CSIP.

III.1.3.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución

Para mantener el pH de la disolución constante se requirió una cuidadosa regulación de la presión parcial de CO₂ debido a la alta reactividad en disolución del vidrio **S72.5P2.5**. Tras 7 días de ensayo, las concentraciones de Ca (II) y de Si (IV) en disolución aumentaron de 2.5 a 3.1 mM y de 0 a 2.1 mM, respectivamente. Por el contrario, la concentración de fósforo en disolución disminuyó de 1 a 0.06 mM. En la Figura 26 se muestran estas variaciones de la concentración iónica en el **CSIP**.⁸⁶

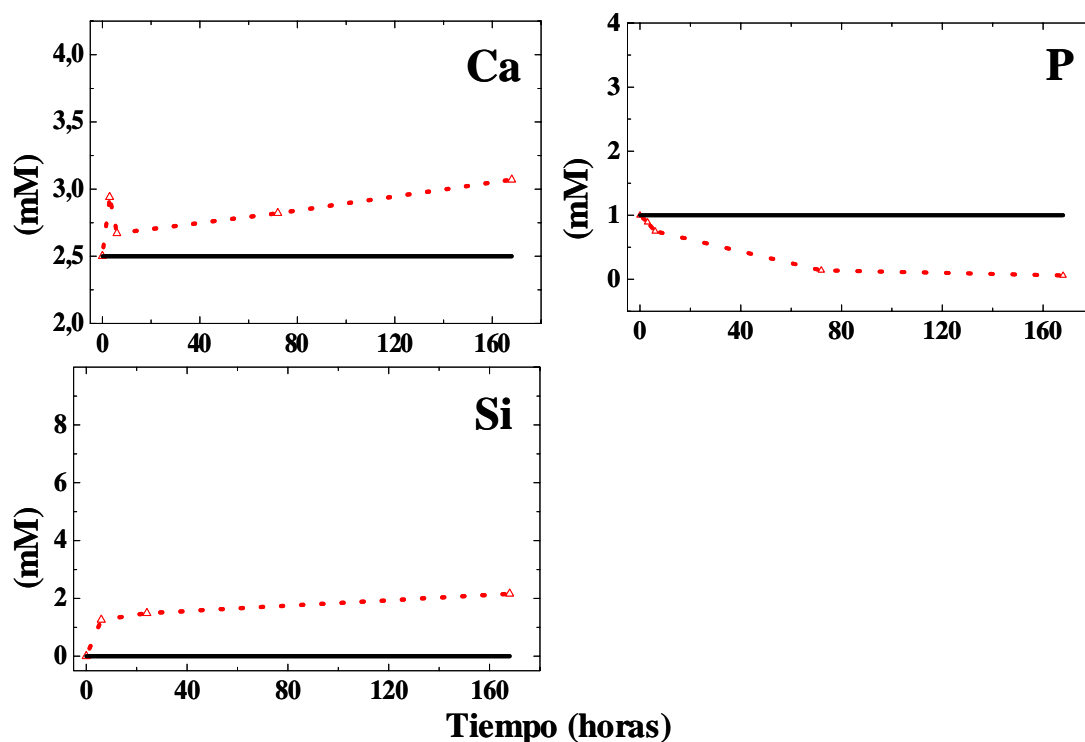


Figura 26: Variaciones en las concentraciones iónicas en **CSIP** para el vidrio **S72.5P2.5** con el tiempo de ensayo en comparación con las concentraciones en el plasma humano. Con este protocolo, el pH se mantuvo constante durante todo el ensayo.

.....△..... **S72.5P2.5**, — **Plasma humano**

III.1.3.c. Estudio de la superficie del vidrio **S72.5P2.5**

El análisis de la superficie de **S72.5P2.5** en **CSIP** se llevó a cabo mediante DRX, IRTF y MEB-EDX.⁸⁶

III.1.3.c.1. DRX

La Figura 27 muestra los difractogramas de rayos-X del vidrio **S72.5P2.5** a distintos tiempos de inmersión en **CSIP**. Tras 7 días de ensayo, aparecen algunas reflexiones de difícil identificación por esta técnica.

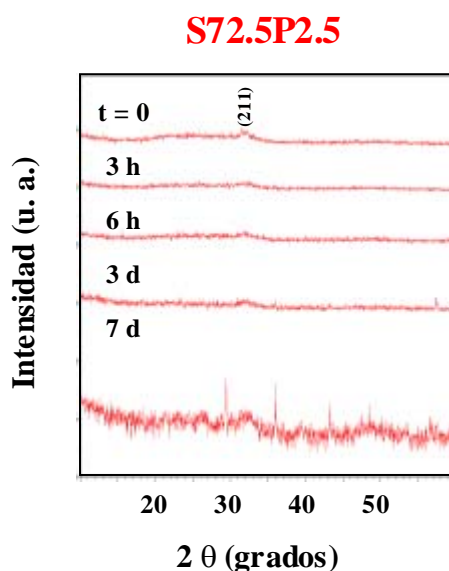


Figura 27: Difractogramas de rayos-X del vidrio **S72.5P2.5** antes y tras diferentes tiempos de inmersión en **CSIP**.

III.1.3.c.2. IRTF

La Figura 28 muestra los espectros IRTF del vidrio **S72.5P2.5** obtenidos mediante reflectancia difusa, antes y tras diferentes tiempos en **CSIP**. Tras 3 horas de ensayo, son visibles las bandas a 1394 y 865 cm^{-1} de carbonato. Además el doblete incipiente a $565\text{-}597\text{ cm}^{-1}$ en el espectro a tiempo cero se está transformando en un singlete de fosfato amorfo. Tras 6 horas, el espectro permaneció similar excepto por el ensanchamiento de la banda a 1090 cm^{-1} , posiblemente debido a su solapamiento con la banda de fosfato a 1035 cm^{-1} . Tras 3 y 7 días, los espectros son similares a los obtenidos para una carbonato hidroxapatita sintética, mostrando bandas de fosfato a 1035 cm^{-1} y $565\text{-}597\text{ cm}^{-1}$ y bandas de carbonato a 1394 y 865 cm^{-1} .^{81,82,86}

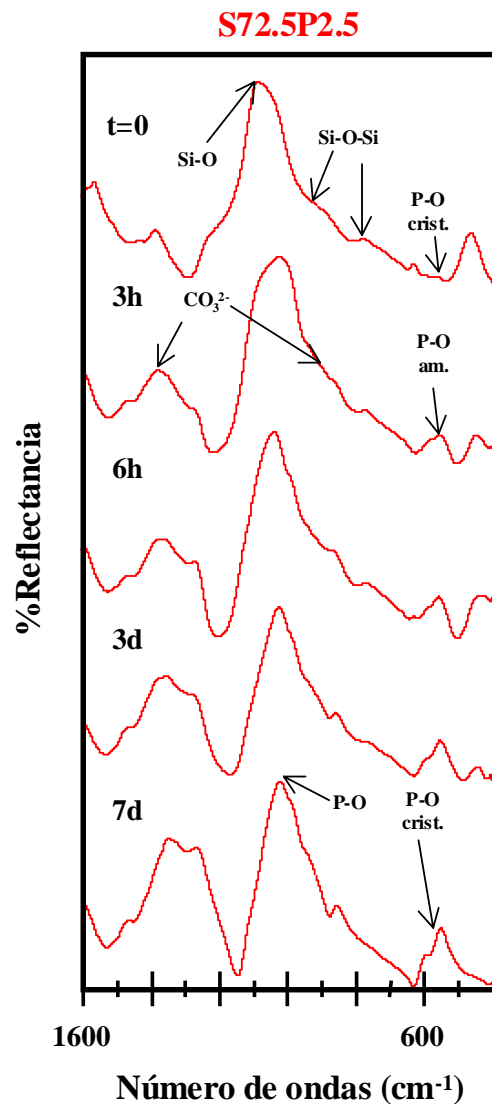


Figura 28: Espectros IRTF del vidrio **S72.5P2.5** antes y tras su inmersión en **CSIP** durante diferentes intervalos de tiempo.

III.1.3.c.3. MEB-EDX

La Figura 29 muestra las imágenes MEB de la superficie de **S72.5P2.5** tras diferentes intervalos de inmersión en **CSIP**. A las 6 horas, apareció una capa de esferas, cubriendo la superficie del vidrio. Tras 3 días, el vidrio está cubierto completamente por aglomerados de partículas característicos de apatita cristalina. Tras 7 días de inmersión, una capa de partículas en forma de copo cubre la superficie del vidrio.⁸⁶

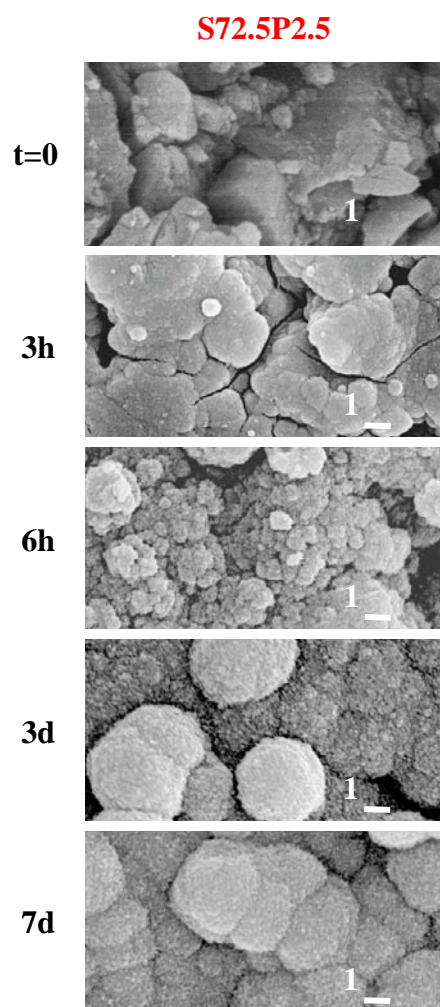


Figura 29: Micrografías MEB de **S72.5P2.5** antes y tras diferentes tiempos de inmersión en **CSIP**.

La Figura 30 muestra la evolución de la composición de la superficie del vidrio **S72.5P2.5** con el tiempo de ensayo en **CSIP** determinada por EDX. La cantidad de silicio disminuyó con el tiempo. Sin embargo, las cantidades de calcio y fósforo aumentaron con el tiempo de ensayo, siendo la relación Ca/P de 2.14 a los 7 días de ensayo. El análisis EDX mostró una mayor relación Ca/P en **CSIP** que en **dinámico**. (Tabla X).⁸⁶

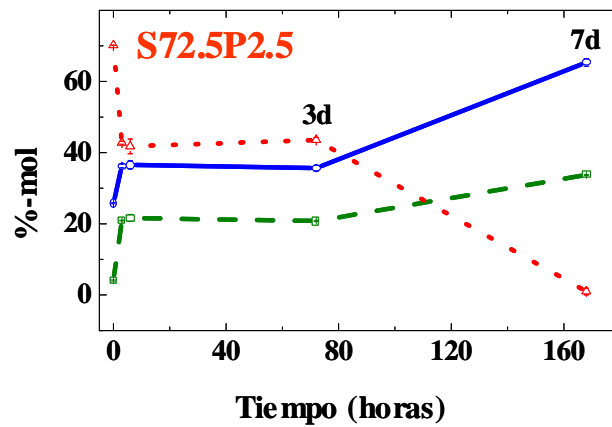


Figura 30: Variaciones en el contenido en Ca, Si y P de la superficie de **S72.5P2.5** con el tiempo de ensayo en **CSIP** determinadas mediante EDX.

—○— Ca,△..... Si, ---□--- P

La Figura 31 muestra la micrografía de la sección transversal del vidrio **S72.5P2.5** y las distribuciones de los elementos a lo largo del perfil tras 7 días de ensayo en **CSIP**. El espesor de la capa, 1 μm , es muy dependiente del protocolo de ensayo empleado (Tabla X).⁸⁶

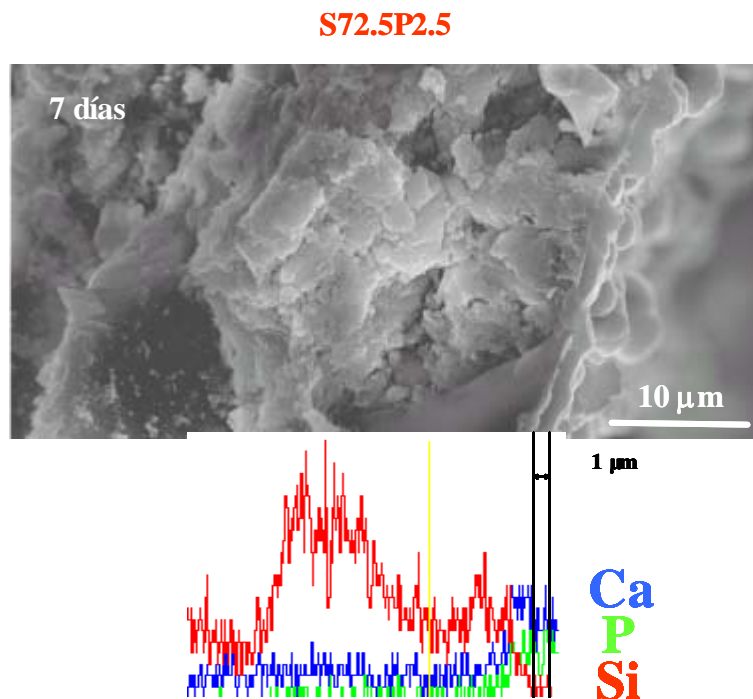


Figura 31: Micrografía MEB de la sección transversal del vidrio sol-gel **S72.5P2.5** tras 7 días en **CSIP**. Se incluye la distribución a lo largo del perfil de los elementos Ca, P y Si.

III.1.3.d. Comportamiento de S72.5P2.5 en CSIP

Los resultados observados permiten establecer que:

- En **CSIP** se observa una mayor velocidad de cristalización de la capa de CHA que en **SBF dinámico** y **estático**. Esto podría ser debido a un mayor aumento de la saturación local como consecuencia de las características del **CSIP** en comparación con el SBF.
- La mayor relación Ca/P tras 7 días en **CSIP** que en **SBF dinámico** puede atribuirse a la coprecipitación de carbonato de calcio. Al mismo tiempo, esto justificaría el relativamente bajo incremento de la concentración de calcio en disolución en comparación con el protocolo **estático**.

Las diferencias entre los distintos protocolos de ensayo *in vitro* estudiados se muestran en la Tabla X.⁸⁶

Tabla X: Comparación entre el tiempo de cristalización de la capa de apatita, el espesor de dicha capa y la relación Ca/P en la misma a los 7 días de ensayo de **S72.5P2.5** en **SBF estático, dinámico** y **CSIP**.

Vidrio	Sistema	Tiempo de cristalización de CHA (días)	Espesor de la capa tras 7 días (µm)	Relación Ca/P tras 7 días
	Estático	4	2	2.31
S72.5P2.5	Dinámico	3	6.23	1.94
	CSIP	1	1	2.14

III.1.4. SBF enriquecido con albúmina (SBF + alb)

III.1.4.a. Protocolo SBF + alb

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo sumergiendo las muestras en 40 ml de SBF a 37°C, al que se había añadido 4 g/l de albúmina de suero bovino (Serva[®], fracción V, pH 7, liofilizada) durante intervalos desde 1.5 horas a 7 días.⁸⁷

III.1.4.b. Variaciones en las concentraciones iónicas de la disolución

La Figura 32 muestra las variaciones de las concentraciones de calcio, silicio y fósforo y del pH con el tiempo de inmersión en **SBF + alb** para los vidrios **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5**. Tanto las variaciones de pH como las de Ca (II) con el tiempo de ensayo son análogas para los tres vidrios. A los 7 días, el Ca (II) en disolución aumentó de 2.3 a 8.3 mM y el pH de 7.4 a 7.9. Estos valores fueron inferiores a los valores de concentración de Ca (II) y de pH alcanzados en **SBF estático** (Figura 11).

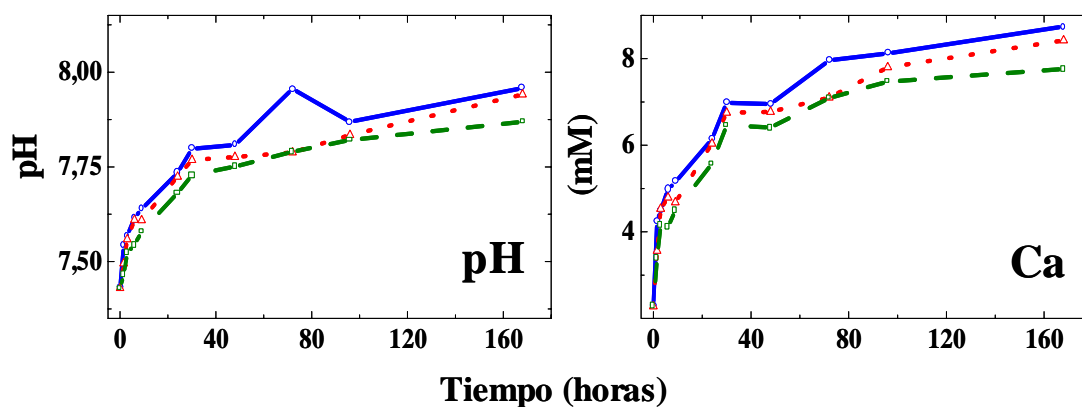


Figura 32: Variaciones en las concentraciones de calcio y en el pH en **SBF + alb** con el tiempo de ensayo en comparación con las concentraciones en el plasma humano.

—○— **S75**, —△— **S72.5P2.5**, —□— **S70P5**

III.1.4.c. Estudio de la superficie de los vidrios

Las variaciones en la superficie de las piezas de vidrio con el tiempo de ensayo se siguieron mediante IRTF-ATR y MEB-EDX.

III.1.4.c.1. IRTF

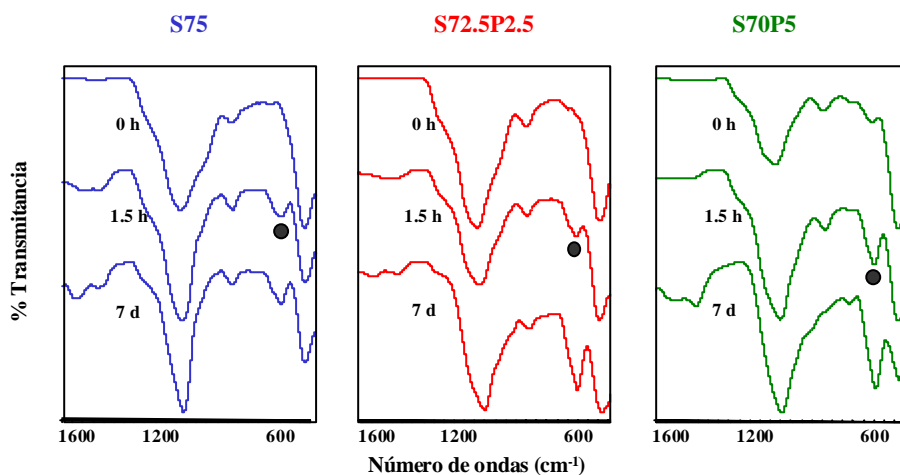


Figura 33: Espectros IRTF de los vidrios sol-gel antes y tras su inmersión en **SBF + alb** durante diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 33 muestra los espectros de IRTF-ATR de los vidrios sol-gel para tiempos de inmersión de hasta 7 días. En los tres vidrios, tras 1.5 horas en **SBF + alb**, se observó la banda de fosfato amorfo a 560 cm^{-1} , análogamente a lo que ocurre en **SBF estático** sin proteína. La intensidad de esta banda fue aumentando con el tiempo, pero ni tan siquiera tras 7 días se observó el doblete a $560, 600\text{ cm}^{-1}$ de un fosfato cristalino.^{81,82}

III.1.4.c.2. MEB-EDX

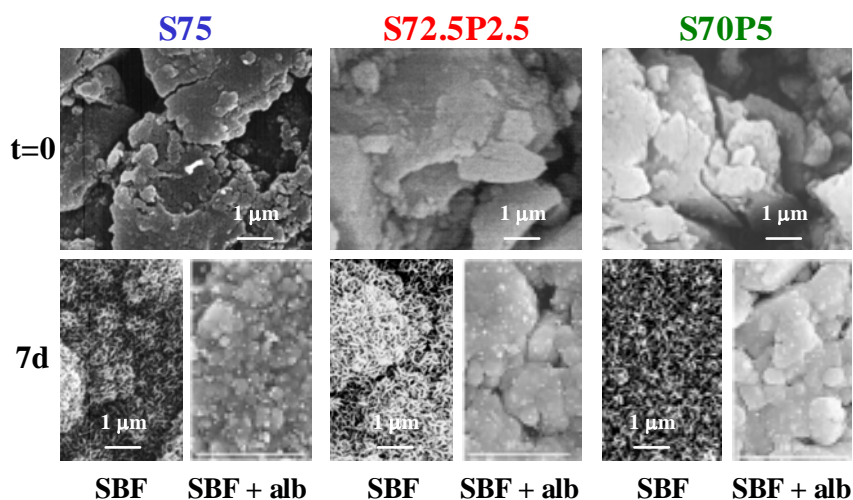


Figura 34: Micrografías MEB de los vidrios antes y después de 7 días de inmersión en **SBF estático** y en **SBF + alb**.

La Figura 34 muestra las micrografías MEB de los vidrios sol-gel antes y después de los ensayos *in vitro* en **estático**. El estudio por MEB indica que en **SBF + alb** las muestras se van recubriendo de una capa pero cuando se compara esta evolución con la que experimentaron en **SBF estático**, se aprecia una ralentización en la cinética de formación de la capa. Por tanto, la influencia de la albúmina en la formación del fosfato amorfo inicial es muy pequeña, pero la cristalización de la apatita se retarda por la presencia de la proteína.

III.1.4.d. Cinética de adsorción de albúmina

La cinética de adsorción de albúmina (Figura 35) se estudió sumergiendo los vidrios en **SBF + alb** entre 1 y 12 minutos y midiendo por IRTF-ATR la variación de la intensidad de la banda de amida I (centrada a 1650 cm^{-1}) que se normalizó asignando el valor de 1 a la banda más intensa.⁸⁸ El aumento de intensidad en tiempos muy cortos (inferiores a 3 minutos) hasta 0.6 para el vidrio con más fósforo, **S70P5**, y 0.4 en los otros dos casos, mostró la rapidez de adsorción de proteína en los vidrios. Para tiempos mayores se encontraron escasas diferencias entre los tres vidrios, lo que se atribuyó a sus composiciones muy parecidas y, en particular, al mismo contenido en calcio, ya que dado el carácter ácido de la albúmina, es de esperar que se una a los vidrios por interacción con los iones Ca^{2+} .⁸⁸

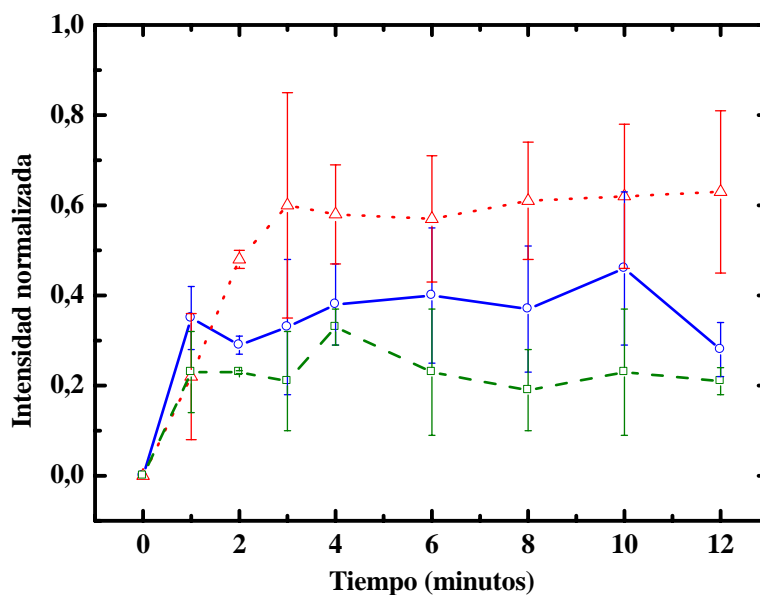


Figura 35: Cinética de adsorción de albúmina sobre S75, S72.5P2.5 y S70P5.
 —○— S75,△..... S72.5P2.5, ---□--- S70P5

1.1.4.e. Comportamiento de los vidrios en **SBF** + **alb**

El protocolo **SBF** + **alb** permitió evaluar la influencia de la albúmina, en el comportamiento *in vitro* de los vidrios. Los estudios cinéticos de adsorción de albúmina sobre los vidrios en **SBF** + **alb** demostraron que en los tres casos la adsorción de albúmina en la superficie de los vidrios tiene lugar a tiempos muy cortos (de 1 a 3 minutos) y con diferencias pequeñas entre los tres vidrios, lo que se ha atribuido a sus composiciones muy similares, en particular el mismo contenido en CaO. La cristalización de la capa de apatita no se produjo ni tras 7 días en **SBF** + **alb**, lo que indica que la albúmina dificulta la cristalización de la capa CHA.

III.2. Biocompatibilidad

III.2.1. Protocolo de los cultivos celulares de osteoblastos

Antes de emplear los biomateriales en los ensayos de cultivos celulares, todas las piezas de vidrio, con o sin recubrimiento de capa de apatita (Figura 36) se esterilizaron mediante calor seco a 120°C durante 18 horas. Por otra parte, debido a la naturaleza altamente reactiva de los vidrios sol-gel, que podría producir altas concentraciones de iones en disolución, las piezas fueron sumergidas y enjuagadas en medio de cultivo antes de colocar las células sobre su superficie.^{89,90}

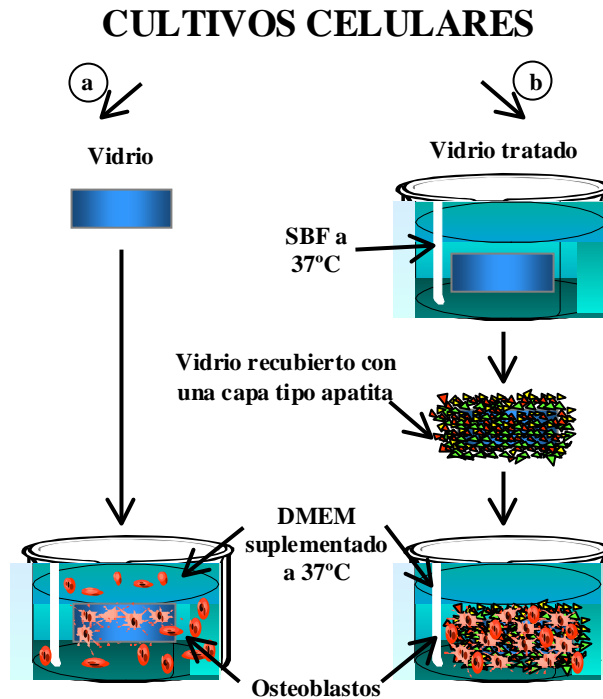


Figura 36: Esquema que indica los dos modos en que se llevaron a cabo los cultivos de osteoblastos sobre vidrios: **(a)** sin recubrir y **(b)** en los que se ha inducido la formación de una capa CHA por inmersión en SBF.

Las fuentes de los osteoblastos fueron ratas Wistar neonatas (de menos de un día) de donde se aislaron empleando digestión secuencial y colagenasa.⁹¹ Rápidamente, bajo condiciones de esterilidad, se retiraron los huesos parietales de la calota disecada, se cortó en tiras el periostio, y se desmenuzaron los huesos con tijeras. Después de un lavado con fosfato salino tamponado y estéril (PBS: 0.15 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) suplementado con 200 U (unidades) de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina, se digirió el tejido durante 30 minutos a 37°C en una disolución estéril de colagenasa en PBS 0.25 % (P/V) (Tipo IV, Sigma). A continuación, se eliminó el sobrenadante y los fragmentos de hueso se incubaron en disolución reciente de colagenasa durante 2 horas a 37°C. Luego, se recogió la suspensión por decantación y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Las células así obtenidas se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dubecco (DMEM) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y un 10 % de suero fetal bovino. A continuación, se situaron las células en botellas de cultivo y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 95 % de aire y 5 % de CO₂ en un medio de cultivo estándar, suplementado posteriormente con ácido ascórbico preparado recientemente (50 µg/ml) y β-glicerofosfato (10 mM). Los osteoblastos se subcultivaron rutinariamente por tripsinización [0.05 % (P/V) de tripsina y 0.02 % (P/V) EDTA en PBS]. En los experimentos aquí descritos se emplearon las células entre el segundo y el cuarto pasaje. Las células preparadas de esta manera expresan un fenotipo osteoblástico, con la morfología típica, expresión de actividad de fosfatasa alcalina y síntesis de osteocalcina y colágeno tipo I.^{90,91}

III.2.1.a. Cinética de adhesión celular

Los osteoblastos de rata se sembraron en los materiales esterilizados y se determinó la **adhesión** celular tras diferentes tiempos de incubación comprendidos entre 30 minutos y 24 horas. Con este propósito, las células fueron marcadas isotópicamente durante 24 horas con 6 $\mu\text{Ci/ml}$ de metil- $[\text{}^3\text{H}]$ timidina (Amersham, Aylesbury, UK; 3.15 TBq/mmol, 85 Ci/mmol) y recogidas de la botella de cultivo mediante tratamiento con tripsina/EDTA y centrifugación a 800 g durante 5 minutos, como se describió previamente.⁹² Las células se resuspendieron en medio de cultivo carente de metil- $[\text{}^3\text{H}]$ timidina, suplementado como se describe previamente, y se sembraron a $5\text{-}10 \times 10^4$ células/cm² directamente sobre los discos de material en placas de 24 pocillos e incubaron bajo condiciones estándar. Tras diferentes períodos de tiempo, las células liberadas fueron separadas por decantación del medio de cultivo y lavadas tres veces con dodecilsulfato de sodio (SDS) y cuantificadas mediante contaje de centelleo (Beckman LS3801) incluyendo también la pastilla de vidrio en el vial de centelleo. Se incluyeron los controles para la adsorción a tiempo cero: se añadieron osteoblastos marcados a los materiales, se eliminaron inmediatamente y se procesaron las pastillas como se mencionó antes. Se llevaron a cabo dos experimentos distintos con muestras duplicadas y los datos representan los valores medios \pm la desviación estándar (SD).

Las diferencias entre los valores medios se analizaron con SigmaSat v2.2 (SPSS, Chicago, IL, USA) y empleando el test t de Student donde el valor del coeficiente p, que se mencionará sucesivas veces, es el nivel de significación.⁹⁰

III.2.1.b. Preparación de las muestras para MEB

El grado de **extensión** de los osteoblastos sobre las células se visualizó por MEB a diferentes tiempos. Las células adheridas se lavaron 4 veces con PBS y se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído en tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.4, durante 30 minutos a 4°C. La deshidratación se llevó a cabo mediante sustitución lenta de agua por una serie de soluciones de etanol cada vez más concentradas antes del punto crítico de secado (CPD) lo que se realizó en un equipo CPD 030. Este es un punto de presión y volumen conocidos donde no hay diferencia entre el líquido y el gas, siendo la tensión superficial interfacial próxima a cero. Se aprovecha normalmente para secar células manteniendo su morfología. Las muestras se montaron en soportes y se recubrieron a vacío con oro empleando un metalizador Balzers SCD 004 y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido en un equipo JEOL JSM-6400.⁹⁰

III.2.1.c. Incorporación de metil-[³H] timidina

Los osteoblastos se recogieron mediante tratamiento con tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio de cultivo suplementado y se sembraron a $5-10 \times 10^4$ células/cm² directamente sobre las piezas de material. Tras 24 horas, el medio de cultivo se sustituyó por un medio con metil-[³H] timidina (1 µCi/ml; 3.15 TBq/mmol, 85Ci/mmol) y las células se mantuvieron en cultivo durante otras 24 horas. Luego, se eliminó el medio y las células se lavaron varias veces con PBS y, después, se solubilizaron con NaOH 0.1N con 0.1 % SDS, y se cuantificaron por conteo de centelleo, como se describió previamente.^{93,94} Se llevaron a cabo dos ensayos independientes con muestras duplicadas y los datos representan la media aritmética ± los valores de desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo como se describió previamente.⁹⁰

III.2.1.d. Actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina de las células cultivadas sobre los vidrios sin recubrir y recubiertos de CHA se empleó como marcador clave para seguir la **diferenciación** celular. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó utilizando el kit comercial Sigma Diagnostic ALP[®], basado en la hidrólisis del fosfato de *p*-nitrofenilo a *p*-nitrofenol. Con ese propósito, se sembraron osteoblastos a 1.5×10^4 células/cm² directamente sobre los vidrios sol-gel recubiertos y sin recubrir en placas de 24 pocillos. Las muestras se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo empleando medio suplementado con ácido ascórbico recién preparado (50 µg/ml) y β-glicerofosfato (10 mM). La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó tras 6 semanas de cultivo. La capa celular se lavó 2 veces con PBS y se extrajo con TRIS 10 mM, pH 8.0, con NaCl 140 mM y Triton X-100 2 % (V/V). Tras la homogeneización, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina en extractos celulares. Se utilizaron cultivos celulares paralelos (por duplicado) para determinar el número de células en cada muestra por tripsinización y conteo celular en un hemocitómetro. La actividad enzimática se expresa como unidades de sustrato transformadas por célula. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes con muestras duplicadas.

III.2.2. Adhesión celular a los vidrios

La cinética de **adhesión** celular a los materiales estudiados, tras diferentes tiempos de incubación de 30 minutos hasta 12 horas, se muestra en la Figura 37. Los valores iniciales de **adhesión** son bastante similares; siendo la pendiente inicial ligeramente inferior para **S70P5** (5.7×10^4 cpm/h) intermedia para **S72.5P2.5** (7.2×10^4 cpm/h) y máxima para **S75** (8.1×10^4 cpm/h). Sin embargo, a tiempos de incubación mayores (4-12 horas) la **adhesión** a **S70P5** es mayor que para los otros dos vidrios. La

adhesión celular a **S75** y **S72.5P2.5** mejora cuando estos vidrios están recubiertos por apatita; no sólo se detecta un incremento de la pendiente inicial (13.2×10^4 y 8.1×10^4 cpm/h, respectivamente) sino que también se observa un mayor grado de **adhesión** en comparación con los vidrios sin recubrir (Figura 37). En **S70P5** sólo se observa un ligero incremento en la **adhesión** de osteoblastos tras recubrirse de una capa de apatita.⁹⁰

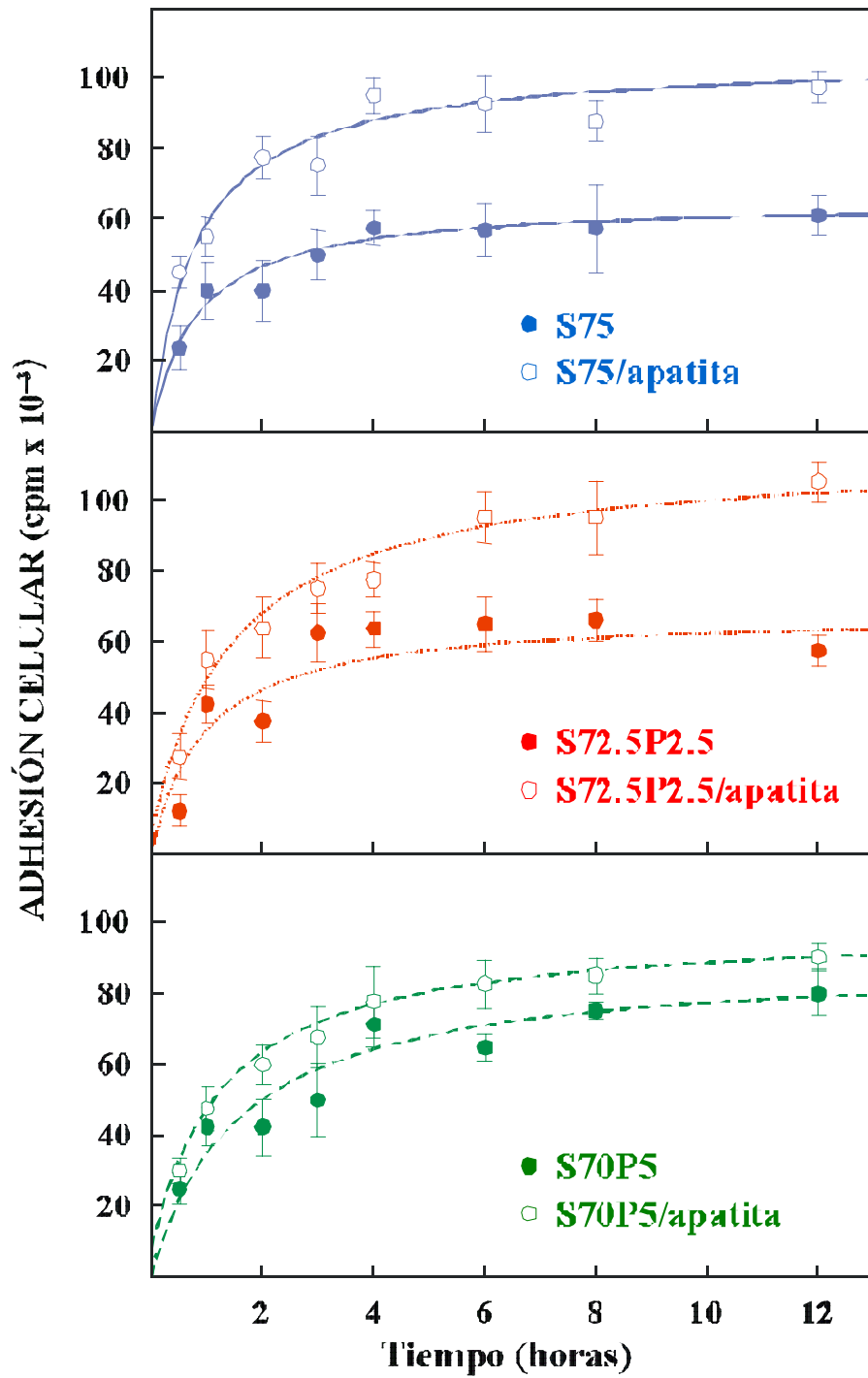


Figura 37: Estudio cinético de la **adhesión** de osteoblastos a vidrios sol-gel bioactivos. Los osteoblastos radiomarcados se sembraron a $5-10 \times 10^4$ células/cm² directamente sobre las piezas de material.

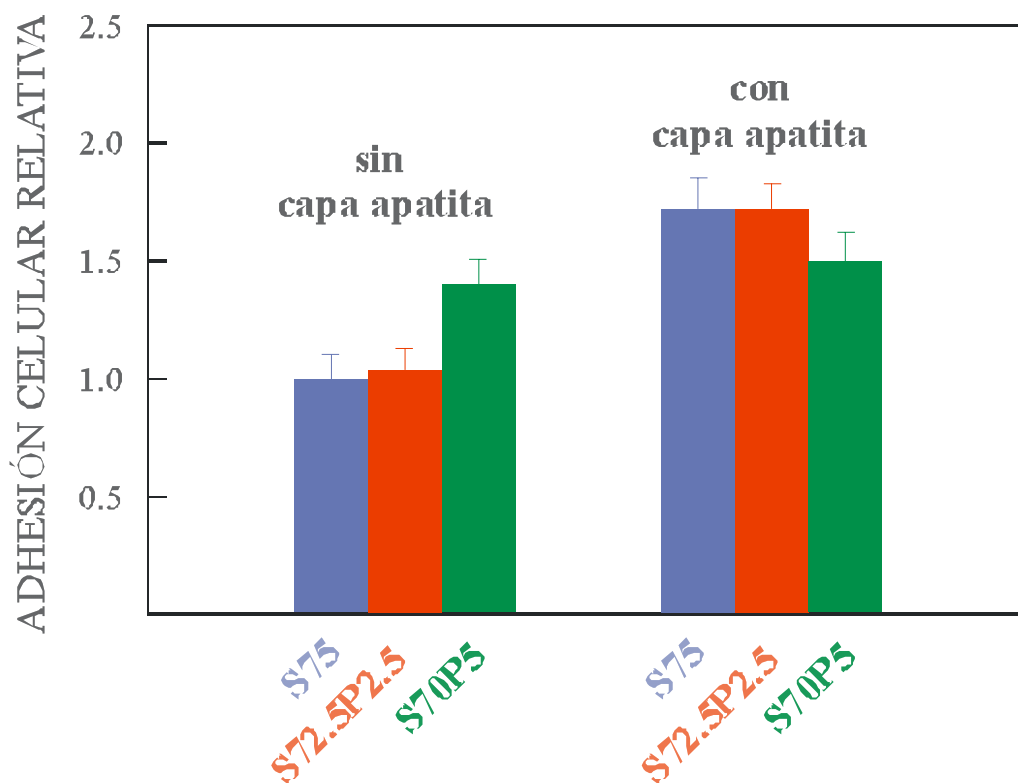


Figura 38: Adhesión a vidrios bioactivos tras 24 horas de incubación sobre los materiales. Los datos se representan en unidades arbitrarias referidos al valor medio para las células adheridas a **S75** sin capa CHA, considerado como 1 (error relativo <10%).

Para evaluar la **adhesión** de los osteoblastos a los materiales estudiados, se han comparado los valores de **adhesión** relativos tras 24 horas de incubación. La Figura 38 muestra los valores de **adhesión** celular en unidades arbitrarias referidas al valor obtenido para células adheridas a **S75** sin recubrir de la capa CHA (considerado como 1). Respecto a los vidrios sin recubrir, **S70P5** presenta una capacidad de **adhesión** de osteoblastos 1.4 veces mayor que **S75** y **S72.5P2.5** ($p < 0.001$) que presentan valores de **adhesión** casi idénticos. Por otra parte, cuando los vidrios están recubiertos con la capa de apatita se observa un incremento significativo en la **adhesión** (aproximadamente 1.7 veces; $p < 0.001$) en **S75** y **S72.5P2.5**, mientras que en **S70P5** se observa únicamente un pequeño incremento (Figura 38). Sólo se observan pequeñas diferencias en la **adhesión** de los tres materiales recubiertos de apatita, siendo inferior en **S70P5** ($p \leq 0.05$) pero los

vidrios recubiertos muestran claramente una mayor capacidad de **adhesión** celular mayor que los vidrios sin recubrir (en todos los casos, $p < 0.001$).⁹⁰

III.2.3. Extensión sobre los vidrios

Se han examinado por MEB los diferentes sucesos que ocurren durante la **adhesión** y **extensión** de osteoblastos sobre vidrios sol-gel (como sustratos). Las Figuras 39 y 40 muestran las micrografías MEB de la **extensión** celular sobre los vidrios sin recubrir tras 3 y 24 horas, respectivamente, de incubación.

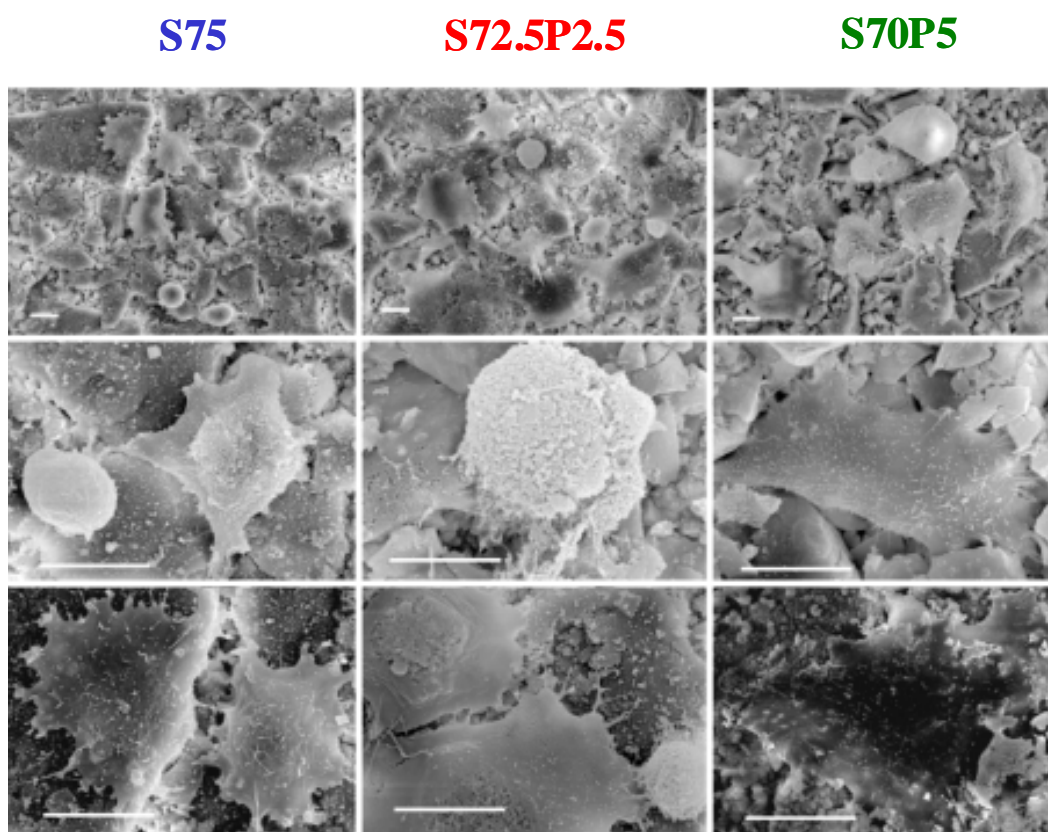


Figura 39: Morfología de los osteoblastos adheridos a los vidrios **sin recubrir** S75, S72.5P2.5 y S70P5 analizados por MEB **tras 3 horas** de cultivo (barra: 15 μm).

La parte superior de la Figura 39 muestra que los osteoblastos adheridos a **S75** y **S72.5P2.5** presentan diferente grado de **extensión**. Se puede observar la aparición de células esféricas con protuberancias en la membrana junto con células más extendidas con una disminución gradual en el número de protuberancias y mostrando aplanamiento celular. Sin embargo, la **extensión** celular en **S70P5** es mayor y más homogénea que en los otros materiales; las células adheridas presentan principalmente un contacto cercano con la superficie, pero además adoptan una morfología extendida con numerosos filopodios y lamelipodios. A pesar de que se detectaron diferencias en el grado de **extensión** celular, en todos los casos las células establecieron contacto íntimo con los materiales, adoptando una morfología extendida y mostrando numerosos filopodios, anclando las células a los vidrios bioactivos. Tras 24 horas de incubación (Figura 40) los osteoblastos presentan una morfología plana sobre los tres materiales; sin embargo, todavía pueden observarse algunas células redondeadas y menos extendidas sobre **S75** y **S72.5P2.5**. La superficie celular en **S72.5P2.5** es más lisa que la superficie celular en **S75** y **S70P5**, donde las células muestran una superficie con alta actividad dorsal con numerosas microvellosidades.⁹⁰

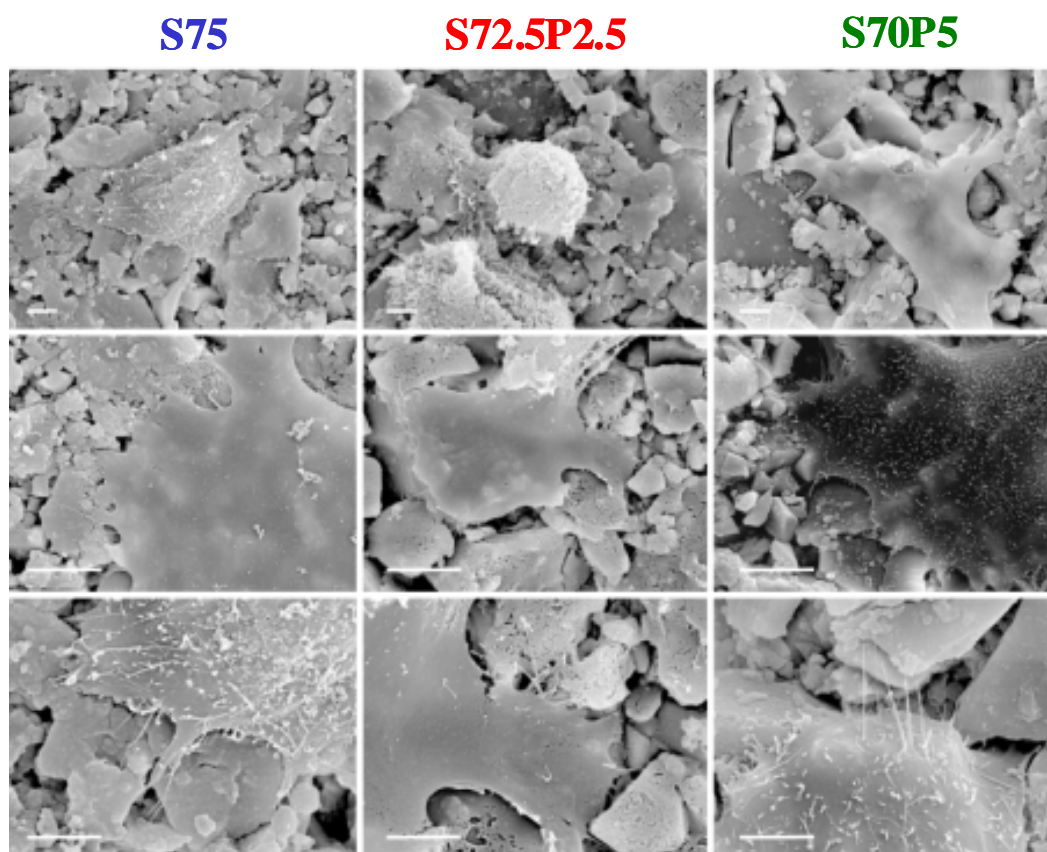


Figura 40: Morfología de los osteoblastos adheridos a los vidrios **sin recubrir** S75, S72.5P2.5 y S70P5 analizados por MEB **tras 24 horas** de cultivo (barra: 10 μ m).

III.2.4. Extensión sobre los vidrios recubiertos de CHA

En la Figura 41, se muestra el efecto de la capa CHA en la morfología de los osteoblastos tras 24 horas de incubación. Los materiales bioactivos se sumergieron en SBF para inducir la formación de una capa CHA, que se puede observar claramente en las micrográficas cuando se comparan con las de los vidrios sin tratar (Figuras 39 y 40). En general, las superficies son más lisas con una apariencia microcristalina y menor número de huecos. Los osteoblastos presentan una morfología más extendida que en los vidrios sin recubrir de CHA tras el mismo tiempo de incubación (Figura 40). El número de filopodios anclando las células a la capa de CHA es mayor con un gran número de protuberancias finas que no son tan abundantes cuando las células se adhieren a los

vidrios sin tratar. Además, los osteoblastos presentan una superficie dorsal más lisa con una reducción significativa en el número de microvellosidades principalmente para las células cultivadas sobre las capas CHA recubriendo los vidrios **S75** y **S70P5**.⁹⁰

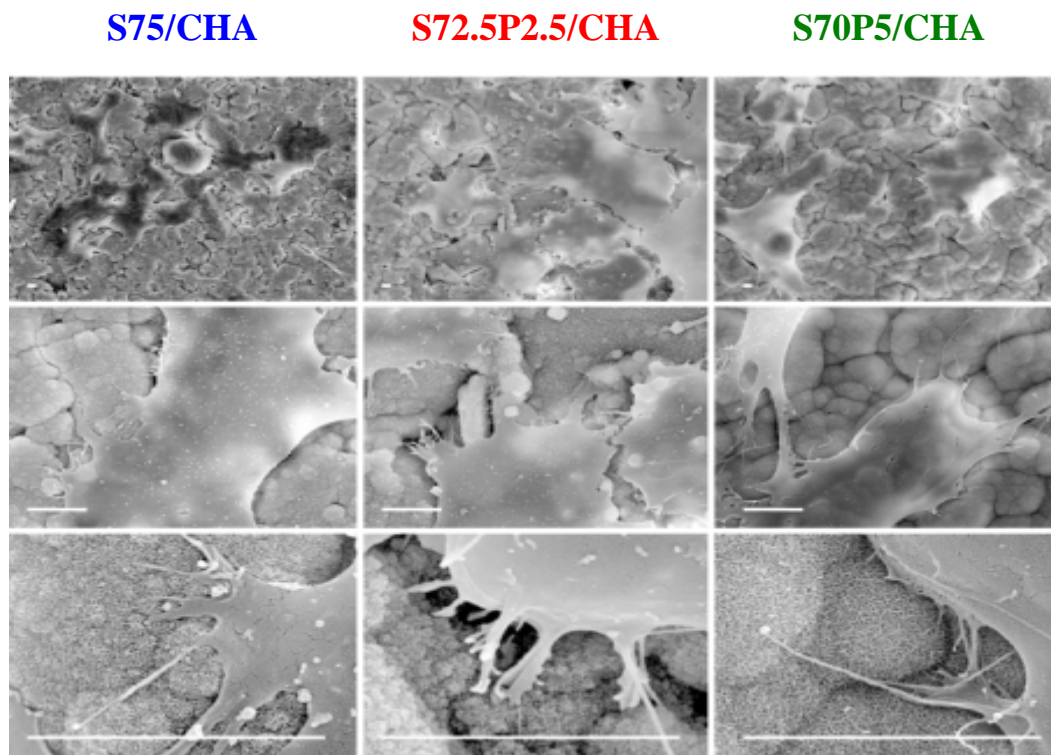


Figura 41: Morfología de los osteoblastos adheridos a los vidrios sol-gel recubiertos con una capa de CHA tras 24 horas de cultivo (barra: 5 μ m).

Las Figuras 42 y 43 muestran la morfología de los osteoblastos cultivados sobre vidrios sol-gel sin recubrir y recubiertos por la capa CHA tras 7 días de cultivo.

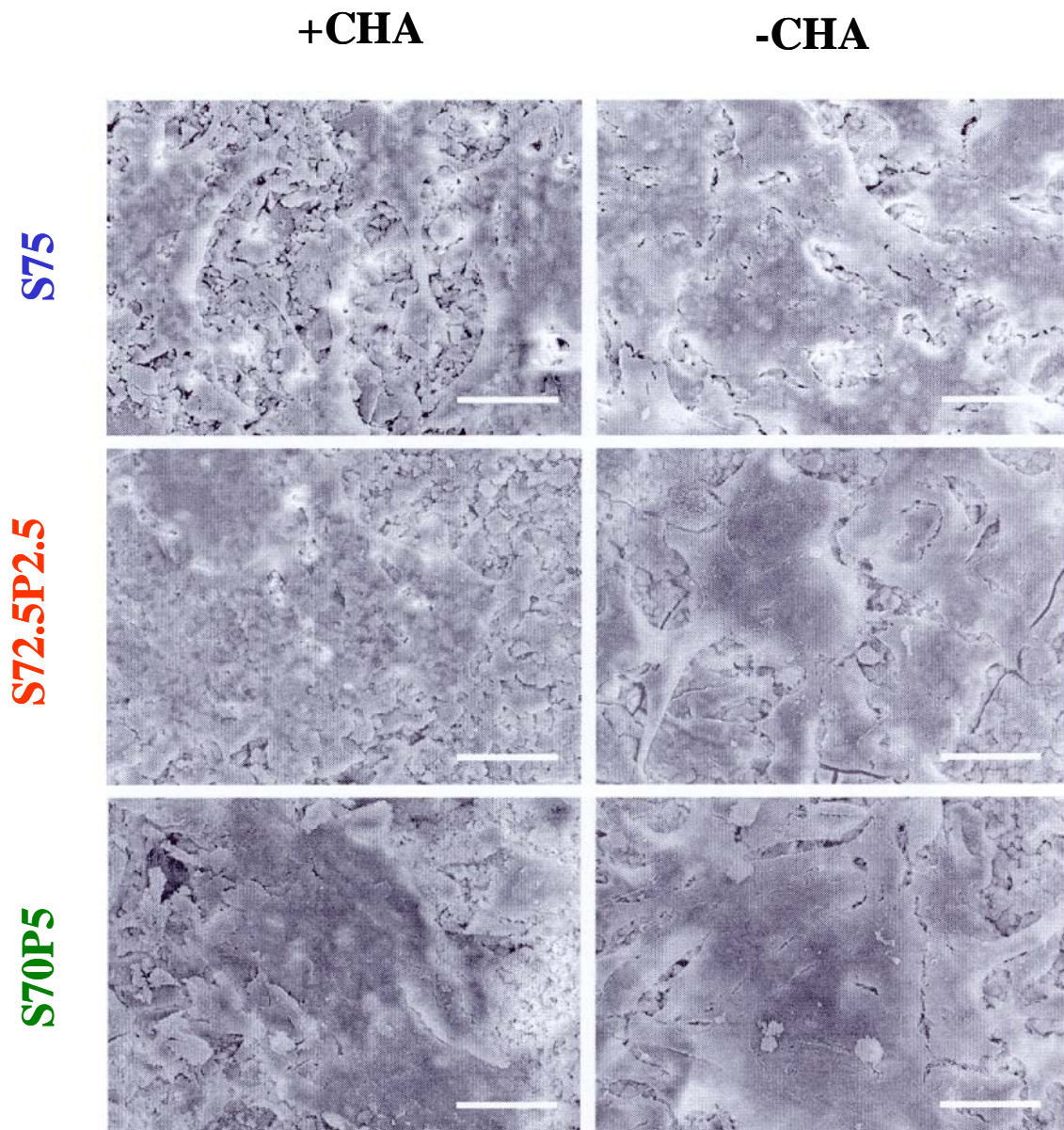


Figura 42: Micrografías MEB de los osteoblastos cultivados **durante 7 días** sobre los vidrios sol-gel bioactivos **S75, S72.5P2.5 y S70P5** con y **sin capa CHA** (barra: 50 μm).

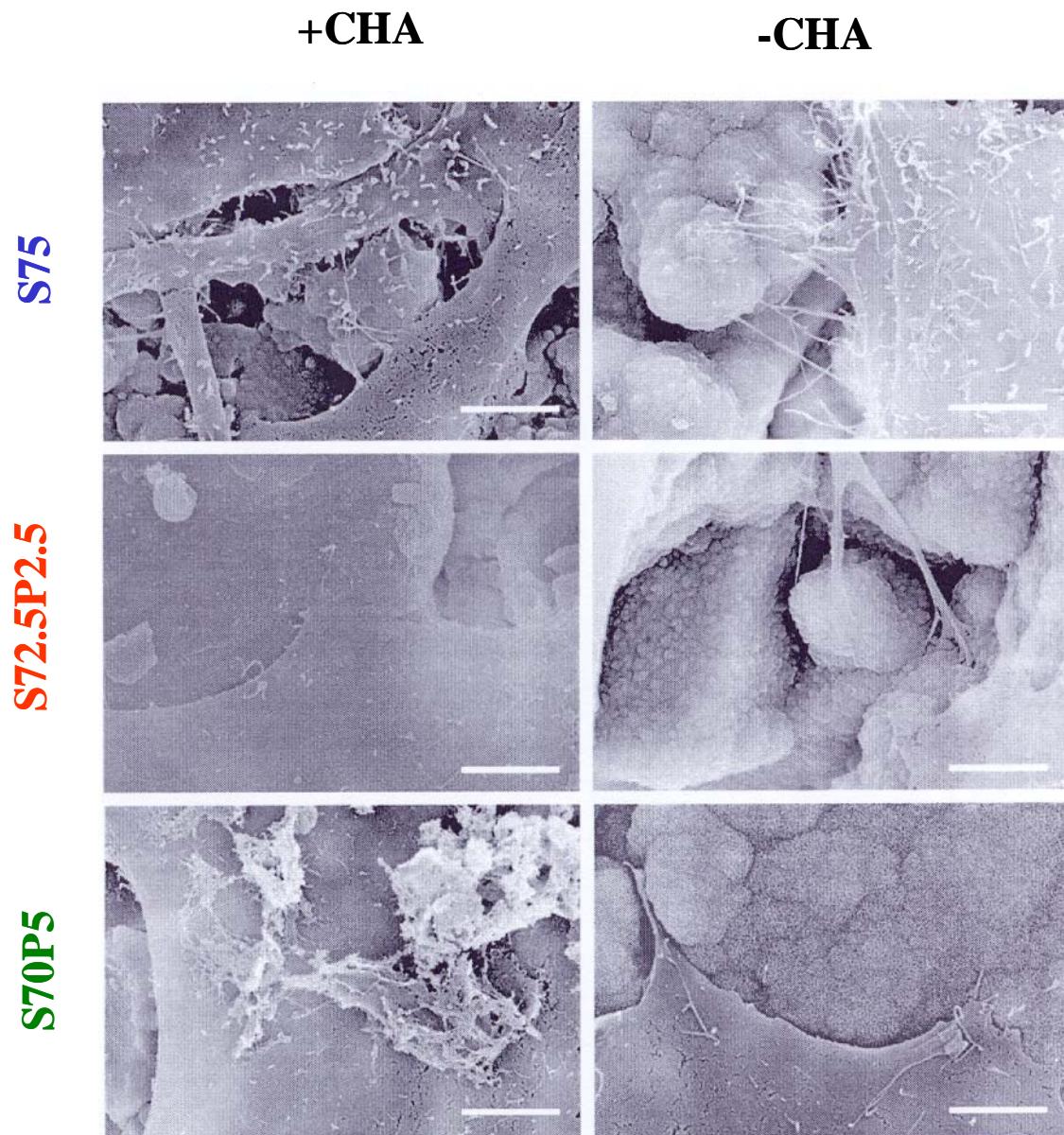


Figura 43: Detalle de la morfología de los osteoblastos sobre los vidrios analizada por MEB. Los osteoblastos se cultivaron durante 6 semanas sobre S75, S72.5P2.5 y S70P5 con y sin capa CHA (barra: 50 μ m).

III.2.5. Proliferación celular

La actividad mitótica/**proliferación** celular sobre los diferentes vidrios y tratamientos se analizó midiendo la incorporación de metil-[³H] timidina (Figura 44). En osteoblastos cultivados sobre vidrios sin tratar, se observa una gran diferencia entre **S70P5** y los otros dos materiales siendo la incorporación de metil-[³H]timidina 1.84 veces superior en el primero ($p < 0.001$). Cuando las células se cultivan sobre vidrios recubiertos de apatita, resulta evidente un incremento general en la **proliferación** celular en comparación con los materiales sin tratar: 4.2, 3.4 y 1.9 veces en **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5**, respectivamente ($p < 0.001$). Por otro lado, se encontraron pequeñas diferencias entre los tres vidrios recubiertos de apatita en lo que respecta a la **proliferación** celular, ligeramente superiores en el vidrio **S75** recubierto con una capa de CHA en comparación con los otros dos vidrios ($p \leq 0.05$).⁹⁰

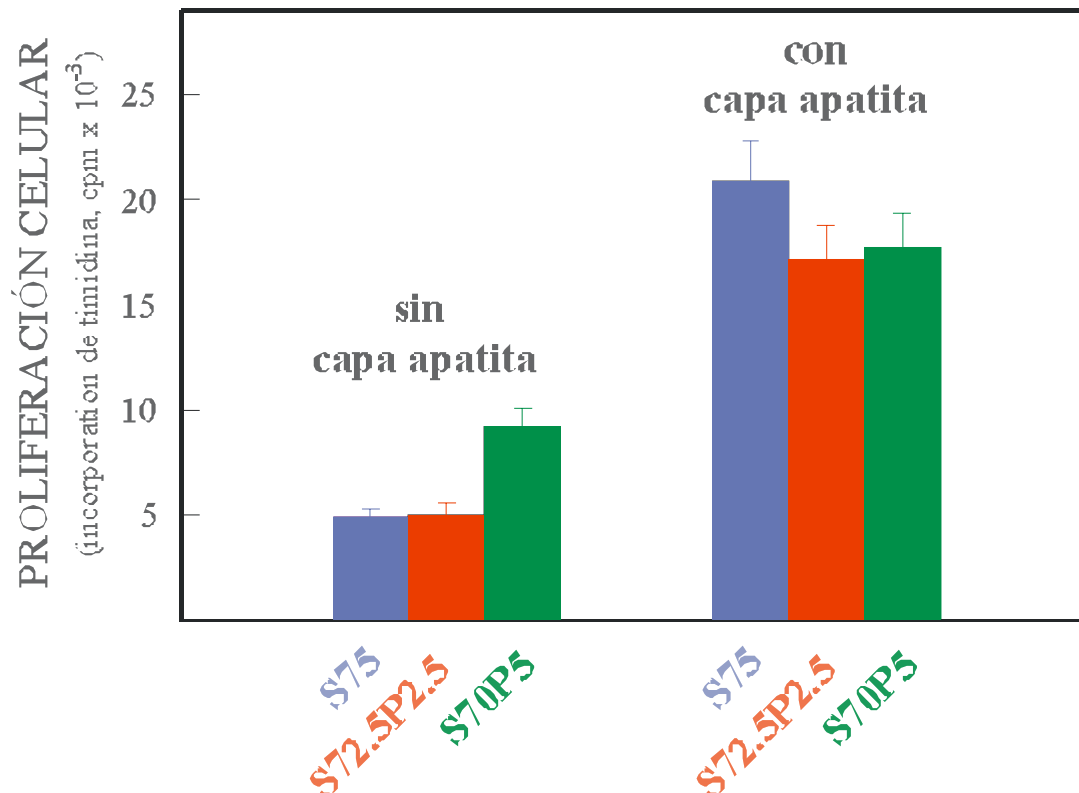


Figura 44: Proliferación de osteoblastos sobre vidrios bioactivos. Los osteoblastos se sembraron a $5-10 \times 10^4$ células/cm² directamente sobre las piezas. **Tras 24 horas**, el medio de cultivo se sustituyó por medio con metil-[³H] timidina y se mantuvo en cultivo **otras 24 horas**. Después, el medio se eliminó y las células se lavaron con PBS, se solubilizaron y cuantificaron por conteo de centelleo.

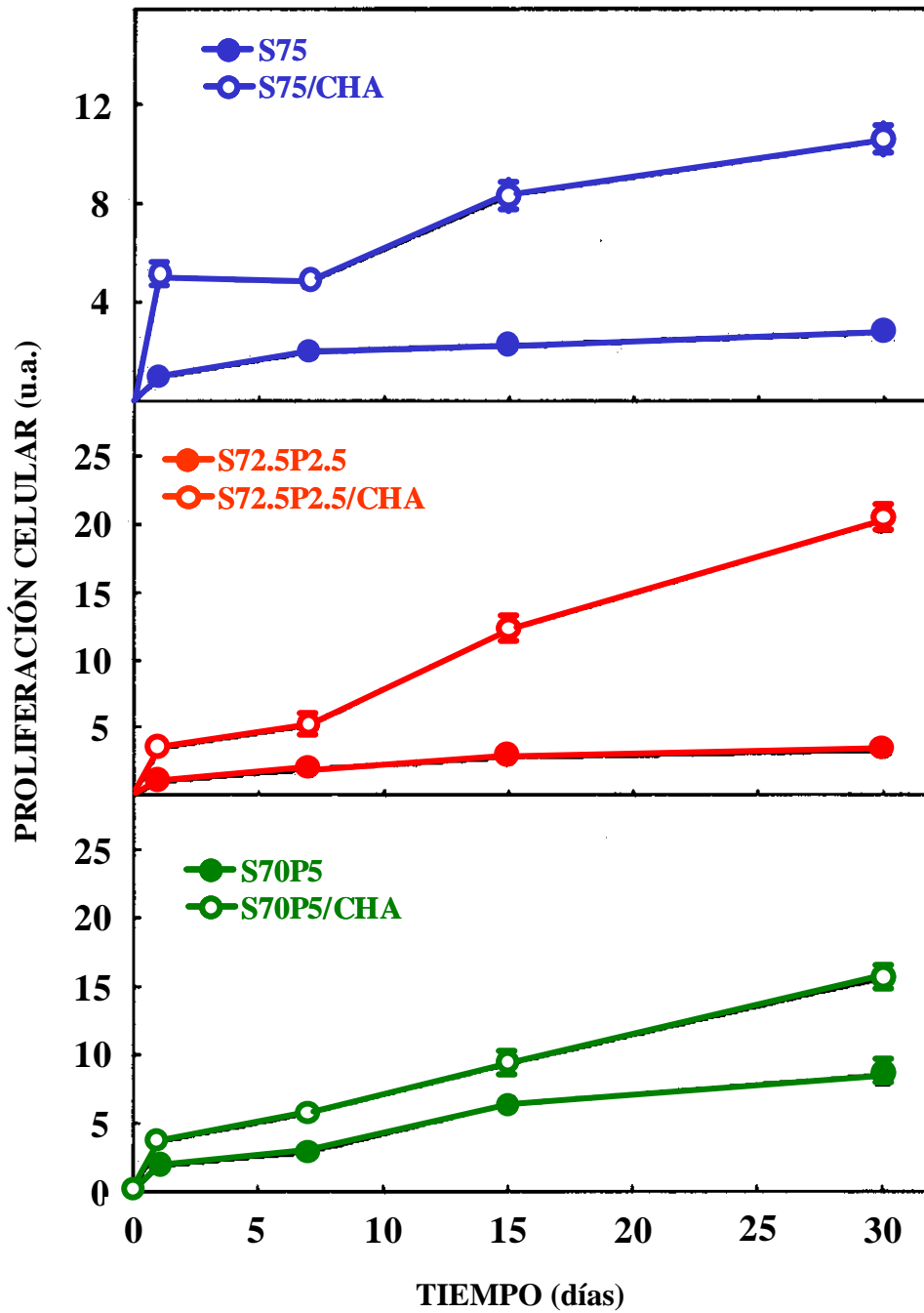


Figura 45: Estudio cinético de la **proliferación** de osteoblastos sobre los vidrios sol-gel. Los osteoblastos se sembraron a 1.5×10^4 células/cm² directamente sobre los discos de material. Tras diferentes períodos de tiempo, se midió la **proliferación** celular por incubación en medio DMEM que contenía metil-[³H] timidina y se mantuvo en cultivo **durante 24 horas**. Tras eliminar el medio, las células se solubilizaron y cuantificaron por conteo de centelleo.

En la Figura 45 se muestra la cinética de **proliferación** en los materiales estudiados tras tiempos de cultivo de 1 a 30 días. En cuanto a los vidrios sin recubrir, los valores de **proliferación** inicial son muy similares pero, con el tiempo en cultivo, la **proliferación** celular en **S70P5** es mayor que en los otros dos vidrios. De hecho, tras 4 semanas en cultivo, **S70P5** presenta una capacidad de crecimiento osteoblástico entre 3 y 2.5 veces mayor que la de **S75** y **S72.5P2.5**, respectivamente. Por otra parte, cuando los vidrios se recubren previamente con una capa de CHA, la **proliferación** celular mejora significativamente. Se observa un aumento en la **proliferación** celular en **S75** y **S72.5P2.5** (3.8 y 6.2 veces, respectivamente) mientras que en **S70P5** sólo se observa un pequeño incremento (1.8 veces) (Figura 46).

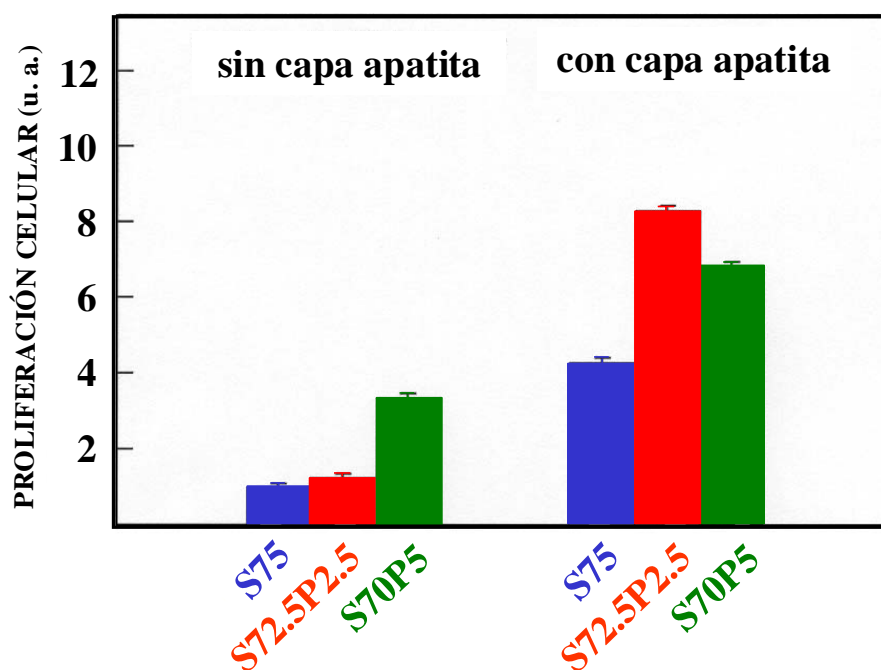


Figura 46: Proliferación de los osteoblastos sobre los vidrios sol-gel **tras cultivos celulares a tiempos largos**. Los osteoblastos se cultivaron **durante 6 semanas**. Tras ese tiempo, la **proliferación** celular se midió por incubación en medio DMEM que contenía metil-[³H] timidina y se mantuvo en **cultivo 24 horas**. Tras retirar el medio, las células se solubilizaron y cuantificaron mediante contaje de centelleo.

Para comparar el crecimiento de los osteoblastos sobre los materiales estudiados se han estudiado los valores relativos de **proliferación** a tiempos de cultivo mayores. La Figura 46 muestra la **proliferación** celular tras 6 semanas en cultivo, en unidades arbitrarias referidas al valor obtenido para células cultivadas sobre el vidrio **S75** sin capa CHA (considerado como 1). En los osteoblastos cultivados sobre los vidrios sin recubrir, se observa una diferencia significativa en la **proliferación** celular entre **S70P5** y los otros materiales, siendo la incorporación de [³H] timidina de 3 a 4 veces mayor en el primero. Sin embargo, cuando las células se cultivan sobre vidrios recubiertos, es evidente un aumento general en la **proliferación** en comparación con los materiales sin tratar. Las células que crecen sobre superficies de CHA exhiben claramente mayor capacidad de **proliferación** que en los vidrios sin tratar aunque se encontraron diferencias entre los tres vidrios recubiertos. La **proliferación** celular aumentó hasta 4.3, 6.7 y 2.1 veces en **S75**, **S72.5P2.5** y **S0P5**, respectivamente.

III.2.6. Actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad del marcador de diferenciación fosfatasa alcalina se determinó tras 6 semanas en cultivo (Figura 47). La actividad enzimática, expresada como unidades de sustrato transformadas/célula, se refiere al valor obtenido para las células cultivadas sobre el vidrio **S75** sin capa CHA (considerado como 1). Bajo las condiciones experimentales empleadas se observa una baja y casi similar actividad cuando las células crecen sobre los vidrios sin recubrir. La actividad de la fosfatasa alcalina es ligeramente superior en **S75** que en **S72.5P2.5** y en **S70P5**. Sin embargo, en todos los casos, se detecta un incremento significativo en la actividad de la fosfatasa alcalina en las células cultivadas en los vidrios donde previamente se formó la capa CHA. Tras 6 semanas en cultivo, la actividad de la fosfatasa alcalina en **S75** fue unas 12 veces mayor

que en **S75** sin recubrir. La actividad en **S72.5P2.5** y **S70P5** aumentó aproximadamente 9 veces.

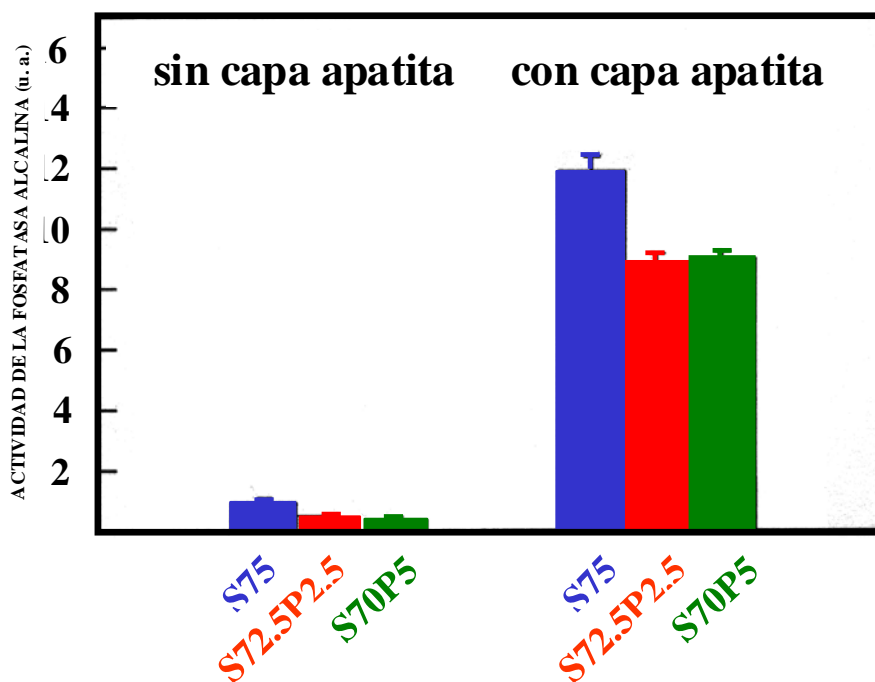


Figura 47: Actividad de la fosfatasa alcalina de las células osteoblásticas cultivadas **durante 6 semanas** sobre los vidrios. Las células osteoblásticas, preparadas y cultivadas sobre la superficie de los materiales se solubilizaron y se midió la actividad de la fosfatasa alcalina en el extracto celular.

III.2.7. Comportamiento de los vidrios sin recubrir y recubiertos con CHA en cultivos de osteoblastos

Los estudios *in vitro* tanto en disoluciones acelulares como en sistemas de cultivos celulares juegan un papel fundamental en el desarrollo de nuevos materiales bioactivos.^{12,95} Cuando un biomaterial se implanta en un tejido huésped, comienzan a tener lugar una serie de interacciones con los tejidos corporales. Además, los denominados materiales bioactivos establecen enlaces químicos fuertes con el hueso. Esta bioactividad depende en gran medida de la composición química de los biomateriales, pero además está muy influenciada por sus propiedades físicas. Los vidrios bioactivos y ciertas cerámicas liberan iones Ca^{2+} a través de un intercambio con los protones de los fluidos corporales cuando se implantan en defectos óseos.⁹⁶ Estas

reacciones inducen la nucleación de apatita y la formación de una capa de CHA biológicamente activa en la superficie de los materiales implantados. Este proceso puede simularse *in vitro* mediante inmersión en SBF, generando una capa tipo CHA.^{16,97} Por esta razón, en esta tesis se ha evaluado y comparado la biocompatibilidad de los tres vidrios bioactivos utilizando cultivos de osteoblastos primarios, es decir, extraídos directamente del tejido óseo. Además, se ha analizado el efecto de una capa de CHA, formada tras sumergir los vidrios en SBF durante 7 días, en la **adhesión y proliferación** de las células osteoblásticas. En primer lugar, se han empleado cultivos de corto plazo, hasta 24 horas, asegurándonos así que no se formará la capa CHA sobre los vidrios. De este modo, se podrá comparar el comportamiento de los vidrios sin recubrir y recubiertos de la capa CHA.^{89,90}

Por otra parte, la presencia de núcleos cristalinos en los vidrios **S72.5P2.5** y **S70P5**, detectada por IRTF y MEB (Figuras 6 y 7) aumentó la velocidad de cristalización de la capa de CHA y por tanto, podría tener un efecto en el comportamiento de las células.

Los vidrios bioactivos pueden crear un entorno localizado en su superficie debido a la liberación de iones al medio de cultivo que podría modificar la **adhesión** de los osteoblastos a estos materiales.^{66,98} Si la liberación de iones es suficientemente elevada, puede no sólo alterar el proceso de **adhesión** celular, sino también matar a las células. Por estas razones, todos los biovidrios, tanto sin recubrir como recubiertos con una capa de CHA, fueron previamente sumergidos en medio de cultivo para prevenir la muerte celular inducida por iones. De este modo, se evitan también las posibles variaciones del pH del medio de cultivo, ya que esta alcalinización podría afectar la

respuesta celular en presencia de los biomateriales.^{66,98} Estos cambios artificiales deberían evitarse incluso a pesar de que algunas reacciones fisiológicas podrían inducir cambios similares. A ese respecto, se ha descrito que los osteoblastos inducen un aumento local en el pH de su entorno local como un paso previo a la inducción de la mineralización.⁹⁹ Los estudios *in vivo* de biovidrios normalmente no incluyen una etapa de preinmersión de los materiales con medio de cultivo o tampones fisiológicos. Teniendo en cuenta la liberación de iones y las variaciones de pH, podría ser aconsejable incluir esta etapa previa a la implantación, incluso aunque estos efectos estarán minimizados en un modelo animal por la dilución en los fluidos fisiológicos.

Se ha observado que los vidrios sin tratar promueven la **adhesión** celular, mejorando este proceso en **S70P5**. Se han propuesto que varias propiedades del sustrato influyen en el comportamiento celular en cultivo. Entre ellas están las propiedades físicas y la topografía (tamaño, porosidad, rugosidad, simetría y regularidad a escala nanométrica, superficie específica, carga, etc.) y la composición química de los materiales. Se ha descrito que el tamaño de poro podría influenciar la reacción celular a los materiales, pero estos efectos sólo se detectan para tamaños de poro en la escala micrométrica y dependen en gran medida del tipo de célula.^{100,101} Los biovidrios aquí descritos no presentan cambios significativos en la porosidad presentando tamaños de poro que varían entre 10.7 nm (**S75**) y 4 nm (**S70P5**) (Figura 9, Tabla VIII); de manera que, esta variación no debería influenciar el proceso de **adhesión**. Sin embargo, se han detectado diferencias cuando se considera la superficie específica de los materiales (327 m²/g en **S70P5** vs. 133 y 153 m²/g en **S75** y **S72.5P2.5**, respectivamente) (Tabla VIII) que podrían contribuir a la mejora de la **adhesión** de los osteoblastos detectada en **S70P5**.

En lo que respecta a la composición química, la **adhesión** mejora significativamente cuando el contenido en P_2O_5 es más alto, incluso si la pendiente inicial de la curva de cinética de **adhesión** celular pueda ser menor que la obtenida para los vidrios con menor contenido en P_2O_5 o nulo (Figura 37). Teniendo en cuenta que estos ensayos de **adhesión** de osteoblastos se han llevado a cabo a tiempos de incubación donde todavía no se ha formado la capa de CHA, estas diferencias deben provenir de la presencia de núcleos de fosfato de calcio o de una determinada distribución de cargas negativas en la superficie de **S70P5** que sería responsable de la mejora del proceso de **adhesión** celular. En este sentido, es bien conocido que la carga del substrato podría afectar el modo de **adhesión** y la actividad biológica de los osteoblastos.¹⁰⁰ También se ha descrito que la composición de un vidrio bioactivo, obtenido por el proceso tradicional de fundido y enfriamiento rápido, para que sea capaz de enlazar directamente con los tejidos vivos es: contenido en SiO_2 inferior al 60 %-mol, alto contenido en Na_2O y CaO y una proporción relativamente alta de CaO/P_2O_5 .¹⁹ La capa CHA mejoró significativamente el proceso de **adhesión** celular probablemente porque esta superficie es reconocida por los osteoblastos como un substrato natural. La mejora de la **adhesión** celular es sólo muy significativa en **S75** y **S72.5P2.5**, siendo mucho menor en **S70P5** que presenta una capa más fina y más heterogénea.

A pesar de que los osteoblastos se adhirieron a todas las superficies analizadas, se han detectado diferencias en el grado de **extensión** celular, principalmente tras 12 horas de incubación. Estas diferencias están probablemente relacionadas con la rápida cinética de **adhesión** detectada para **S70P5** en comparación con los otros vidrios sol-gel, pero casi desaparecen tras 24 horas. Sin embargo, en todos los casos las células establecen contactos íntimos con los materiales, adoptando una morfología plana y

mostrando numerosos filopodios y lamelipodios anclando las células a los vidrios bioactivos.

Sin descartar la importancia de la composición y la carga superficial de los biomateriales, sus características físicas o topografía superficial pueden influenciar grandemente la respuesta celular. De hecho, el proceso de **extensión** celular podría estar influenciado por la naturaleza del substrato y los biomateriales que presentan superficies rugosas inducen una mejor **adhesión** celular que aquellos con superficie celular lisa, tales como el plástico.¹⁰³ Cuando los osteoblastos se cultivan en plástico, adoptan una morfología con forma de aguja. Sin embargo, se vuelven poligonales en la confluencia, una forma celular más similar a la que exhiben los osteoblastos maduros en los tejidos del hueso.¹⁰⁴ Se ha observado que cuando los osteoblastos crecen en la superficie de estos tres materiales bioactivos, recubiertos o sin recubrir con la capa de apatita, estas células adoptan una morfología bastante poligonal. Además, las células se orientan y muestran interconexiones con características similares a aquellas descritas en células alineadas a lo largo de la superficie del hueso trabecular *in situ*.¹⁰⁴ De cualquier modo, es posible que, incluso si todos los materiales inducen reacciones morfogenéticas similares, diferencias sutiles en la rugosidad y química superficial podrían inducir respuestas celulares distintas, como se ha descrito para condrocitos y osteoblastos cultivados sobre ciertas vitrocerámicas bioactivas.¹⁰⁵ De hecho hemos detectado una morfología más plana y una mayor capacidad de **adhesión** celular en los materiales que presentan un recubrimiento de CHA, que cambia las características de las superficies del material mostrando una composición química más similar a la del hueso que la de las superficies sin recubrir. Esto también podría explicar el mayor grado de **proliferación** celular detectado en células cultivadas en las superficies recubiertas, sin

descartar la posibilidad de que esta capa estimule este proceso debido a una mayor unión de proteínas del suero y factores de crecimiento en comparación con los vidrios sin recubrir.¹⁰⁶ Además, *in vivo*, estos materiales recubiertos con una capa tipo apatita, podrían dar lugar a mayores propiedades osteoconductoras y osteoinductivas mediante la unión de BMPs (proteínas morfogenéticas de hueso) circulantes en una manera similar a la apatita ósea.¹⁰⁷

Las diferencias observadas en la cinética de **adhesión** y grado de **extensión** en los materiales sin capa de apatita podrían justificar la mayor actividad mitótica o grado de **proliferación** de los osteoblastos cultivados 24 horas en **S70P5** en comparación con las células cultivadas sobre **S75** y **S72.5P2.5**. Además, la presencia de la capa de CHA no sólo incrementa la **adhesión** y **extensión** celular sobre los tres materiales, sino que también induce un incremento en la actividad mitótica de las células (de 3 a 4 veces mayor que en ausencia de la capa CHA).⁹⁰

Finalmente, en los cultivos a largo plazo, no se observa claramente la formación de una capa CHA sobre la superficie de los vidrios (Figuras 42 y 43). Esto se ha explicado por la presencia de proteínas del medio de cultivo las cuales se van a adherir de modo casi instantáneo a la superficie de los materiales dificultando la formación de la capa de CHA. Dicha explicación se basa en los resultados de los estudios *in vitro* de los vidrios sol-gel en SBF con albúmina en una concentración 10 veces inferior a la del plasma humano. En ellos se vio que en presencia de esta proteína no se llegó a detectar la cristalización de la capa CHA (Figuras 33 y 34).

Capítulo IV: Híbridos basados en vidrios sol-gel y polialcohol vinílico

IV.1. Síntesis de los híbridos

Como reactivos se emplearon tetraetilortosilicato (TEOS, Aldrich[®]) trietilfosfato (TEP, Aldrich[®]) y nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Aldrich[®]) precursores de SiO_2 , P_2O_5 y CaO , respectivamente, y polialcohol vinílico, PVAL (Aldrich[®], hidrolizado al 99%, M_w promedio: 89000-98000 g/mol). La hidrólisis del alcóxido se llevó a cabo con agua destilada, empleando HNO_3 como catalizador.

Los híbridos $\text{CaO-SiO}_2\text{-PVAL}$ y $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-PVAL}$ se obtuvieron añadiendo diferentes cantidades de PVAL (0.9, 1.8 y 3.6 % en masa) durante la síntesis de los vidrios $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5**, todos con 25 % en moles de CaO y 0, 2.5 y 5 %-mol respectivamente de P_2O_5 . El PVAL se disolvió en 50 ml de agua calentando a 80°C a reflujo. Fue necesario calentar para romper los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del polímero. Los híbridos obtenidos se denominaron $\text{H}_{\text{X-Y}}$, donde “X” hace referencia al porcentaje en moles de P_2O_5 e “Y”, al contenido nominal en % en masa de PVAL en los híbridos (Tabla XI).^{108,109}

Tabla XI: Códigos para los híbridos ($\text{H}_{\text{X-Y}}$) obtenidos. “X” hace referencia al porcentaje en moles de P_2O_5 e “Y” al porcentaje en masa de PVAL en los híbridos.

		% -mol de P_2O_5 en los híbridos		
		0	2.5	5
% -masa de PVAL en los híbridos	0.9	$\text{H}_{0-0.9}$	$\text{H}_{2.5-0.9}$	No obtenido
	1.8	$\text{H}_{0-1.8}$	$\text{H}_{2.5-1.8}$	$\text{H}_{5-1.8}$
	3.6	$\text{H}_{0-3.6}$	$\text{H}_{2.5-3.6}$	$\text{H}_{5-3.6}$

En la Figura 48, se muestra un esquema de los procesos para la síntesis sol-gel. Como se puede observar se disolvieron diferentes cantidades de PVAL en agua a 80°C a reflujo durante 30 minutos antes de la adición de los reactivos. Como para la síntesis de los vidrios, se calcularon las cantidades de agua y HNO₃ para la producción de los híbridos para cumplir una relación molar HNO₃ + H₂O / TEOS + TEP de 8 y un pH inicial de 0.5. Se añadieron los reactivos consecutivamente en el siguiente orden: TEOS, TEP (cuando fue necesario) y nitrato de calcio con una hora de agitación entre cada adición. Finalmente, se adicionaron alícuotas de 1.5 ml de la solución resultante a contenedores multipocillos de poliestireno, sellando con cinta de Teflón®. La gelificación tuvo lugar en 3 días a temperatura ambiente. El envejecimiento se llevó a cabo a 60°C durante 2 días y secado a 60°C durante 1 día tras retirar la cinta de Teflón® para permitir la salida de los gases generados durante el secado.^{108,109}

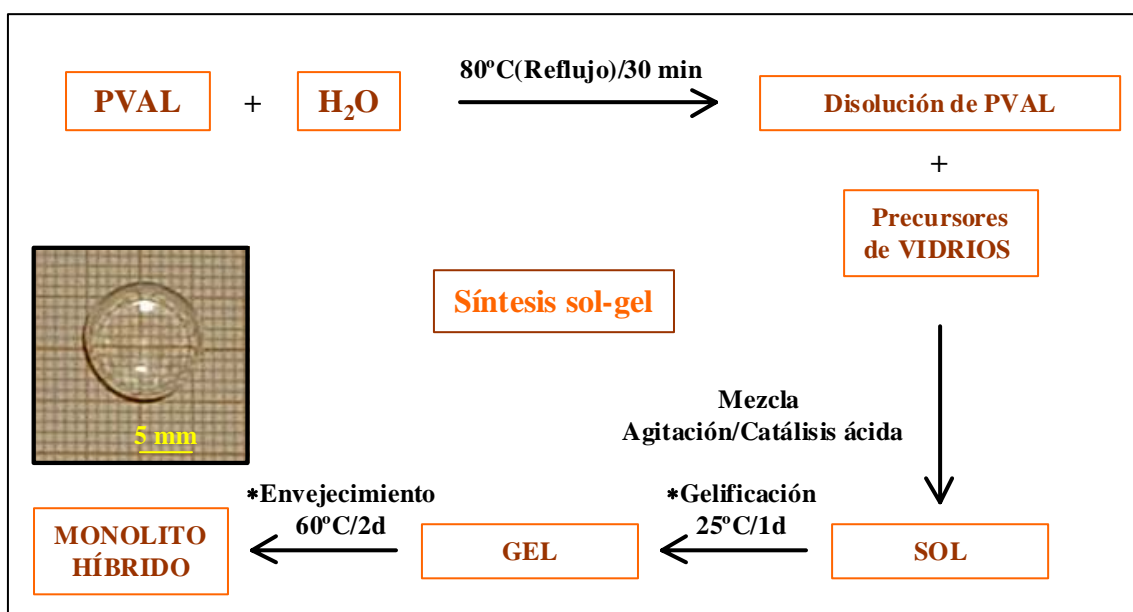


Figura 48: Ilustración esquemática del proceso seguido para la preparación de híbridos CaO-SiO₂-P₂O₅-PVAL. (*) Denota los cambios en comparación con las condiciones de síntesis de los vidrios sol-gel. Todos los híbridos presentaban un aspecto similar. Como ejemplo, se incluye una fotografía del híbrido H_{0.9}.

IV.2. Caracterización de los híbridos

Los híbridos se caracterizaron mediante análisis elemental de carbono, hidrógeno, nitrógeno, DRX, ATG, calorimetría diferencial de barrido, CDB, IRTF y MEB-EDX.

El análisis elemental de CHN de los híbridos (Tabla XII) con P₂O₅ mostró contenidos en carbono mayores que los teóricos en las series y **H_{2.5}** (valor medio 3.5 ± 0.4 % en masa) y **H₅** (6.1 ± 0.1 % en masa) en comparación con la serie **H₀** (0.4 ± 0.2 % en masa). Como puede observarse, el porcentaje de carbono en los híbridos **H₅** fue aproximadamente dos veces el de **H_{2.5}**. Sin embargo, el contenido en nitrógeno fue análogo en todas las muestras (5.7 ± 0.3 % en masa).¹⁰⁹

Tabla XII: Análisis elemental de los híbridos y del PVAL (% en masa).

Muestra	%C	%H	%N
PVAL	53,32	9,15	0
H_{0-0.9}	0.42	2.94	5.86
H_{0-1.8}	0.27	2.68	6.06
H_{0-3.6}	0.56	2.28	6.09
H_{2.5-0.9}	3.74	2.93	5.55
H_{2.5-1.8}	3.08	2.86	5.67
H_{2.5-3.6}	3.75	2.92	5.63
H_{5-1.8}	6.04	3.31	5.35
H_{5-3.6}	6.11	3.29	5.19

La Figura 49 muestra los difractogramas de DRX de los híbridos $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$ y $H_{0-3.6}$. La ausencia de máximos en los difractogramas refleja su carácter amorfo a pesar de que el PVAL empleado es un polímero semicristalino. Los máximos de DRX en el difractograma del polímero se indexaron a partir de datos bibliográficos.¹¹⁰

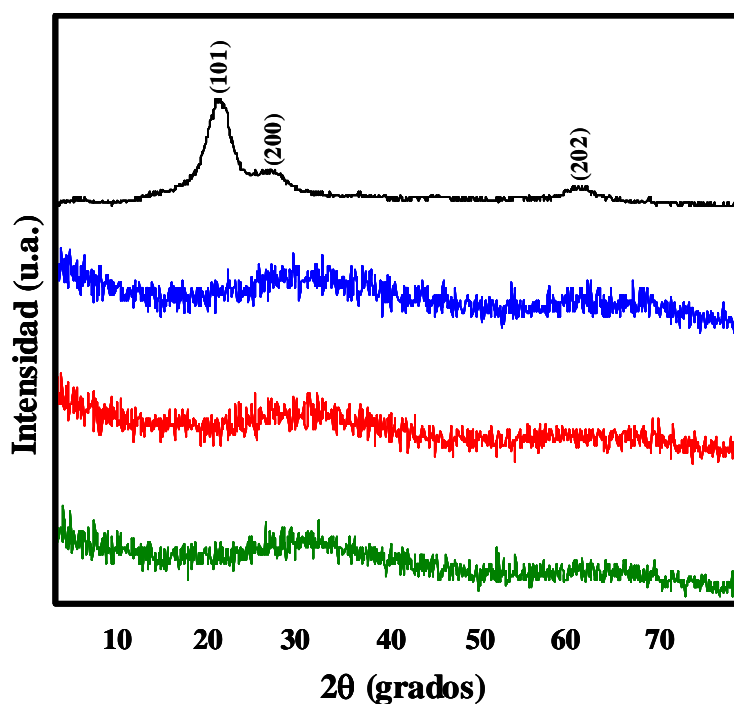


Figura 49: Difractogramas de rayos-X de los híbridos $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$, $H_{0-3.6}$ y del PVAL.

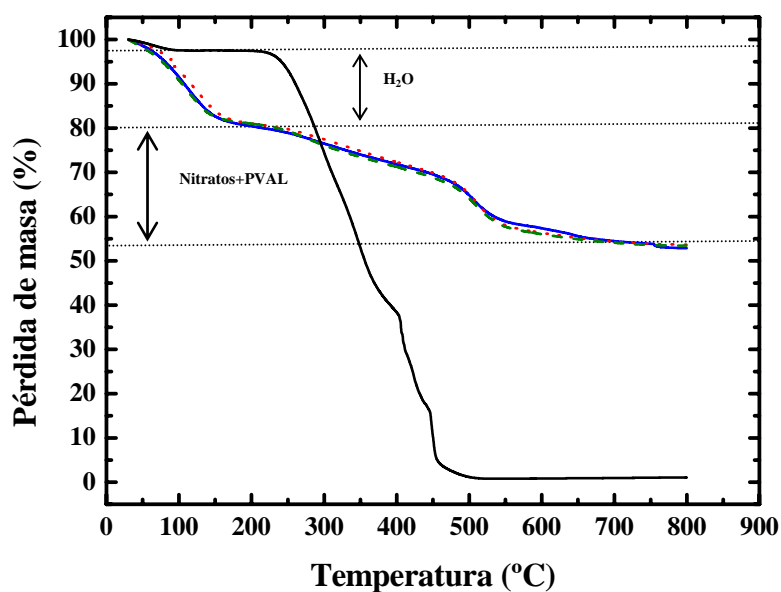


Figura 50: Termogramas de los híbridos $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$, $H_{0-3.6}$ y del PVAL.

La Figura 50 muestra los termogramas del PVAL y de los híbridos $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$ y $H_{0-3.6}$. Como puede observarse, la descomposición total del PVAL tiene lugar entre 225°C y 450°C. En lo que respecta a los híbridos, las tres composiciones presentan un comportamiento similar con pérdidas de masa en dos regiones de temperatura. La primera pérdida, de aproximadamente un 17 %, sucede entre temperatura ambiente y 140°C y podría asignarse a la eliminación de agua. La segunda pérdida de masa, de aproximadamente un 24 %, puede atribuirse a la simultánea descomposición de los grupos nitratos y el PVAL.

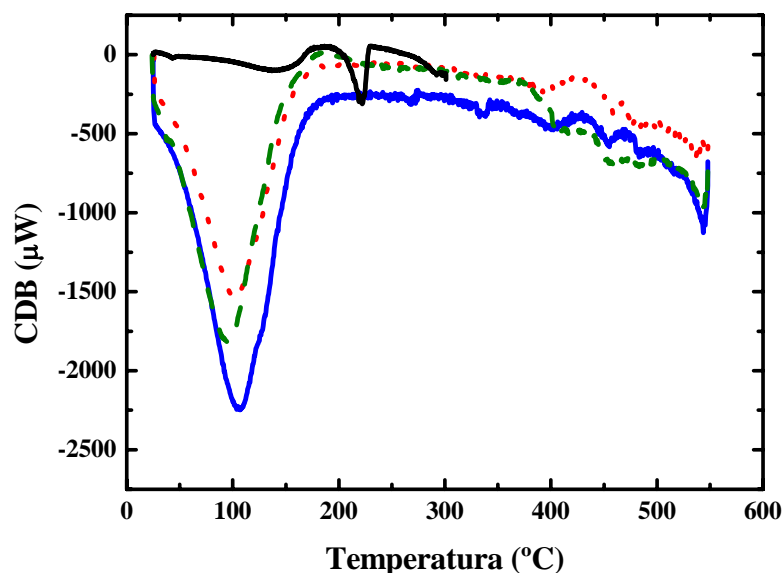


Figura 51: Gráficos de calorimetría diferencial de barrido de $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$, $H_{0-3.6}$ y del PVAL.
 — $H_{0-0.9}$, $H_{0-1.8}$, - - - $H_{0-3.6}$, — PVAL

El estudio por calorimetría diferencial de barrido CDB (Figura 51) mostró una banda endotérmica a 225°C, correspondiente al punto de fusión del polímero. En todas los diagramas de los híbridos, se observa una banda intensa a 100°C, atribuida a la evaporación de la humedad de las muestras, junto con otras bandas de menor intensidad, por encima de 400°C, asignadas a la eliminación de nitratos.¹⁰⁹

El espectro IRTF-ATR de $H_{0,0,9}$ obtenido antes del ensayo *in vitro* ($t = 0$) se muestra en la Figura 52. La ancha banda a 3340 cm^{-1} , característica de O–H, se asignó al solapamiento de estas bandas del PVAL y agua. La banda a 1638 cm^{-1} se atribuyó a la humedad de las muestras. Las bandas a 1416 y 1337 cm^{-1} se atribuyeron a grupos nitrato. Finalmente, las bandas a 1048 , 817 y 438 cm^{-1} pueden asignarse a modos normales Si–O.^{81,82,108,109,111}

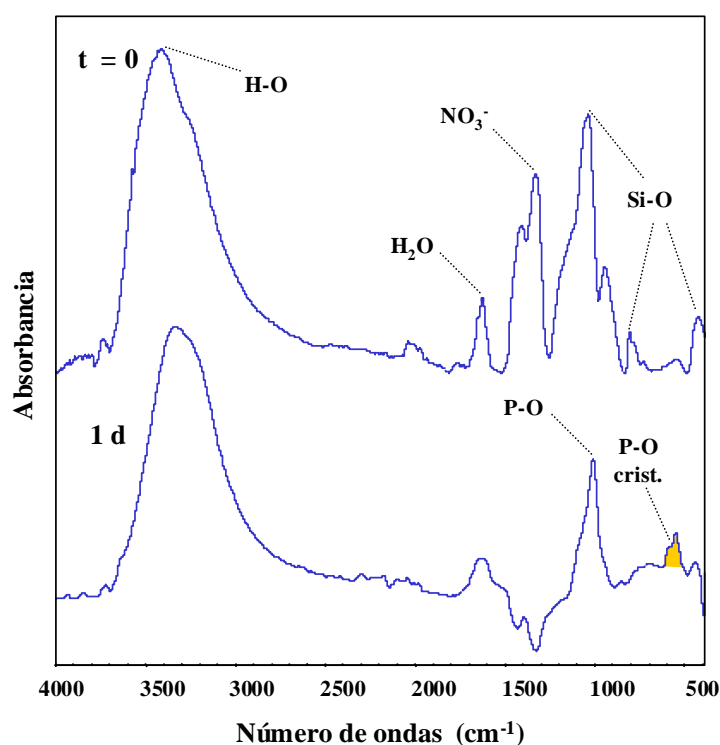


Figura 52: Espectro IRTF de $H_{0,0,9}$ antes y después de su inmersión en SBF durante 1 día.

El análisis de MEB de los híbridos mostró superficies lisas para todas las composiciones estudiadas. Como ejemplo, a la izquierda en la Figura 53 se muestra una micrografía MEB de $H_{0,0,9}$ antes de su inmersión en SBF ($t = 0$).^{108,109}

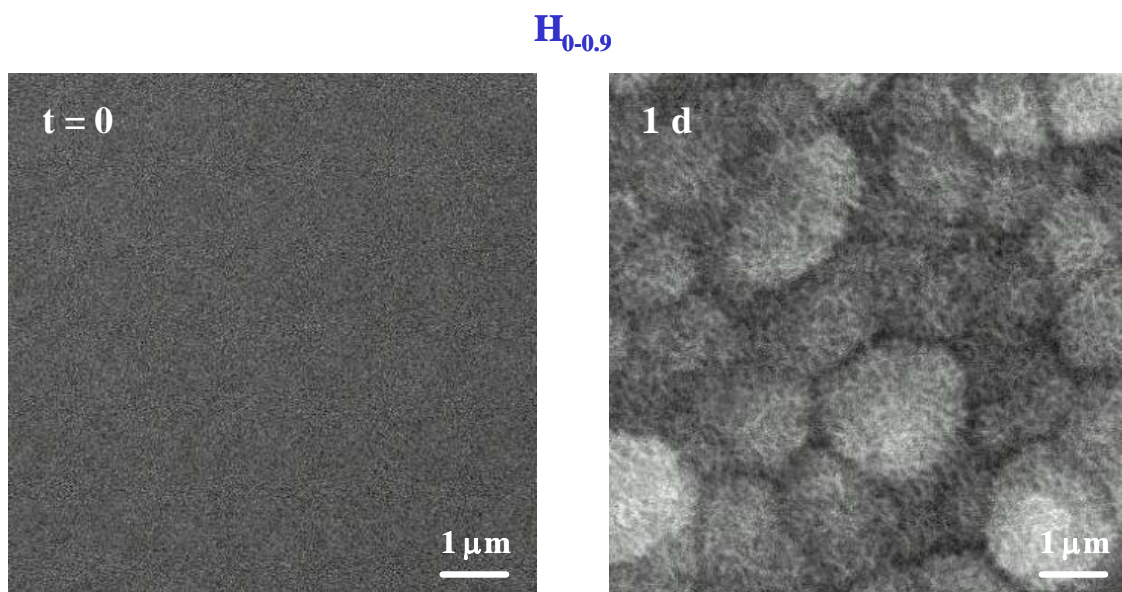


Figura 53: Micrografías MEB del híbrido **H_{0-0.9}** antes y tras 1 día de ensayo.

Tabla XIII: Propiedades texturales de los híbridos determinadas mediante adsorción de N₂.

Híbrido	S _{BET} (m ² /g)	V _p (ml/g)	D _p (nm)
H_{0-0.9}	86	0.064	3.3
H_{0-1.8}	13	0.013	3.2
H_{0-3.6}	16	0.023	3.4
H_{2.5-0.9}	82	0.083	3.6
H_{2.5-1.8}	53	0.049	3.6
H_{2.5-3.6}	58	0.060	3.6
H_{5-1.8}	1.3	0.004	-
H_{5-3.6}	1.6	0.005	-

Las propiedades texturales de los híbridos obtenida mediante adsorción de N₂ se muestran en la Tabla XIII. Una tendencia general observada es una disminución en el área superficial BET y en la porosidad a medida que aumenta el contenido en PVAL en los híbridos. Efectivamente, materiales con idéntica composición, pero sin PVAL, es decir, los vidrios **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5**, presentaron áreas superficiales y porosidades mayores que aquellas de la Tabla XIII (Ver también Tabla VIII en página 38).¹⁰⁹

IV.3. Estudios *in vitro*

IV.3.1. Degradación

Para el estudio de degradación, cada muestra se pesó antes y tras su inmersión en SBF. De este modo se siguió el comportamiento de las muestras en disolución. Se representó el porcentaje de variación de masa de los híbridos frente al tiempo de inmersión. Como ejemplo, la Figura 54 muestra los resultados correspondientes a los híbridos sin P_2O_5 , es decir, los de la serie H_0 . Como se observa, en las 6 primeras horas las muestras se disolvieron rápidamente hasta el 50 % de su masa inicial. Entre las primeras 6 y 24 horas se detectó una pérdida adicional de masa de aproximadamente un 10 %. Posteriormente, la masa permaneció constante hasta el final del estudio. Para las otras series de híbridos los resultados fueron análogos. Así, los híbridos $H_{2.5}$ y H_5 perdieron hasta 60 y 70 % de su masa inicial respectivamente tras 7 días de inmersión.^{108,109}

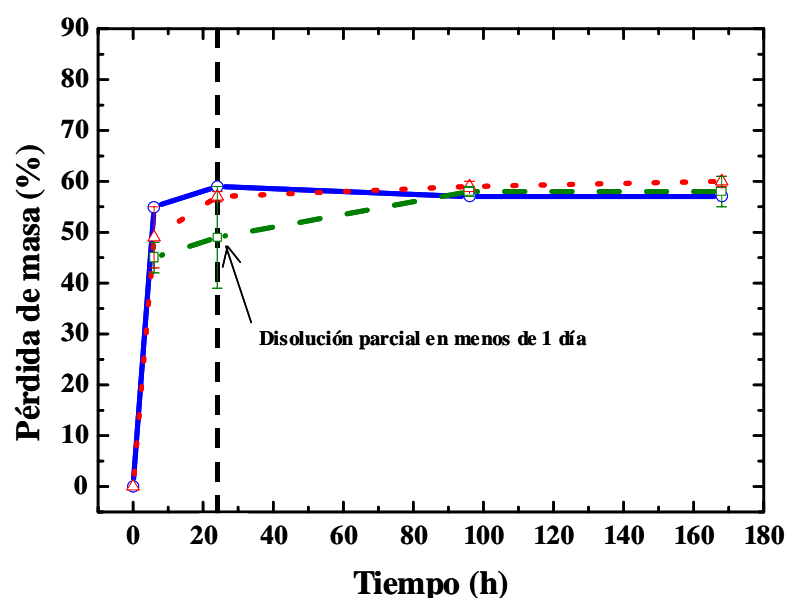


Figura 54: Degradación de los híbridos H_0 con el tiempo de inmersión en SBF.

—○— $H_{0-0.9}$, —△— $H_{0-1.8}$, —□— $H_{0-3.6}$, — PVAL

IV.3.2. Bioactividad

En la Figura 55 se muestran las variaciones de las concentraciones iónicas y del pH en el SBF con el tiempo de ensayo para los híbridos **H₀**. La concentración del ion Ca^{2+} en disolución decayó drásticamente en todos los casos, desde el comienzo del ensayo. Así, varió desde el valor inicial en el SBF, 2.55 mM, a 0.25 mM en 6 horas. Esto puede atribuirse a la precipitación de una sal de calcio. El pH también disminuyó en las 6 primeras horas desde 7.34 a 7.10 y después de eso, permaneció casi constante. La concentración de fósforo también disminuyó con el tiempo. Por tanto, se puede considerar que una parte se incluiría en la capa CHA que se forma sobre el híbrido mientras que el resto precipitaría como sal de calcio en la disolución. Por el contrario, la concentración de silicio en el medio aumentó en las primeras 24 horas de ensayo como resultado de la disolución parcial de las muestras. Este hecho está en concordancia con lo que se observó en los estudios de degradación (Figura 54) donde las muestras experimentaron una pérdida de masa substancial durante el primer día y después, la masa permaneció constante.^{108,109}

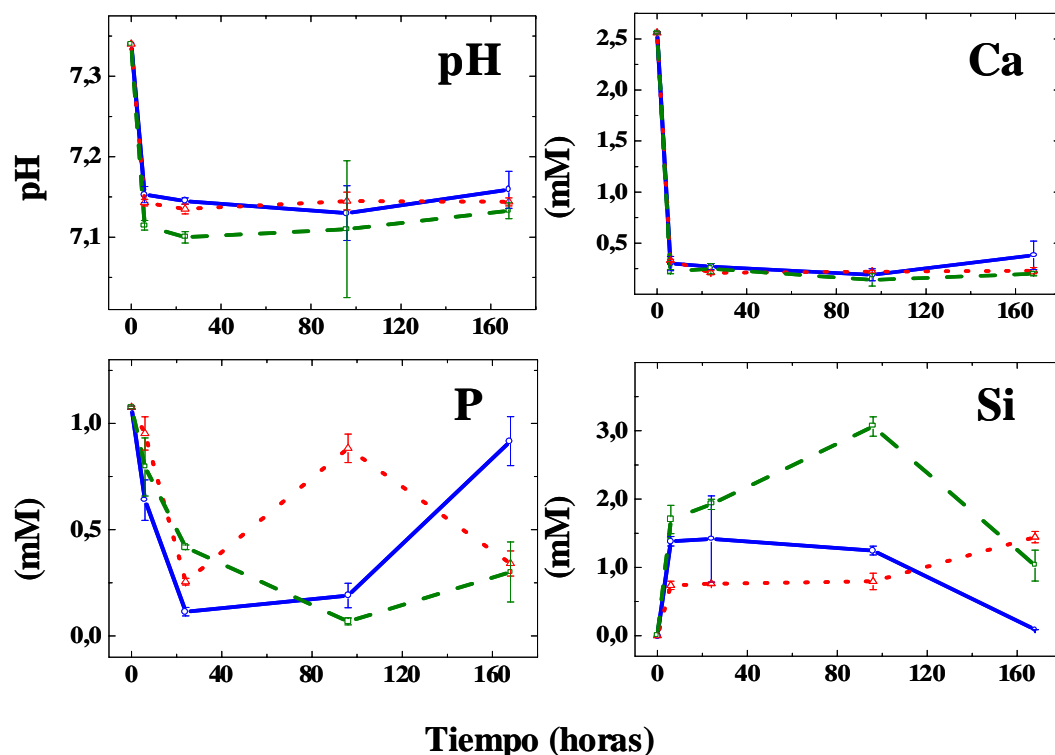


Figura 55: Variaciones iónicas y del pH en el SBF con el tiempo de inmersión.

—○— $H_{0-0.9}$,△..... $H_{0-1.8}$, ---□--- $H_{0-3.6}$

En lo que respecta a la bioactividad *in vitro*, la Figura 52 muestra los espectros IRTF-ATR de $H_{0-0.9}$ antes y tras su inmersión en SBF durante 1 día. En el espectro del híbrido tratado, puede observarse la desaparición de las bandas a 1415, 1334 cm^{-1} atribuidas al nitrato. Asimismo, está presente una banda a 1020 cm^{-1} , característica de grupos fosfato, más fina que la banda de silicato que aparece en esta región. De la presencia del doblete a 598, 561 cm^{-1} , típico de un fosfato cristalino, se dedujo la presencia de una capa tipo apatita.^{81,82,108,109,111} Además, esta capa puede observarse tras 1 día de ensayo, cubriendo la superficie del híbrido $H_{0-0.9}$, en la micrografía de la derecha, mostrada en la Figura 53. Por tanto, los híbridos de los sistemas $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-PVAL}$ son bioactivos.^{108,109}

En la Figura 56 se observan las variaciones de los porcentajes en moles de calcio, fósforo y silicio, determinados por EDX para los híbridos **H₀**. Para las series **H_{2,5}** y **H₅** se han obtenido resultados análogos. Para el calcio puede observarse que tras una disminución en las 6 primeras horas, aumenta hasta las 24 horas de ensayo, momento en que el vidrio cesa de disolverse y puede formarse la capa tipo apatita. En el caso del fósforo, éste aumenta desde el inicio del ensayo y se mantiene a partir del primer día. En el gráfico del silicio se observa una disminución brusca durante el primer día de ensayo, como consecuencia de la formación de la capa de apatita, y a partir de entonces se mantiene prácticamente constante.¹⁰⁹

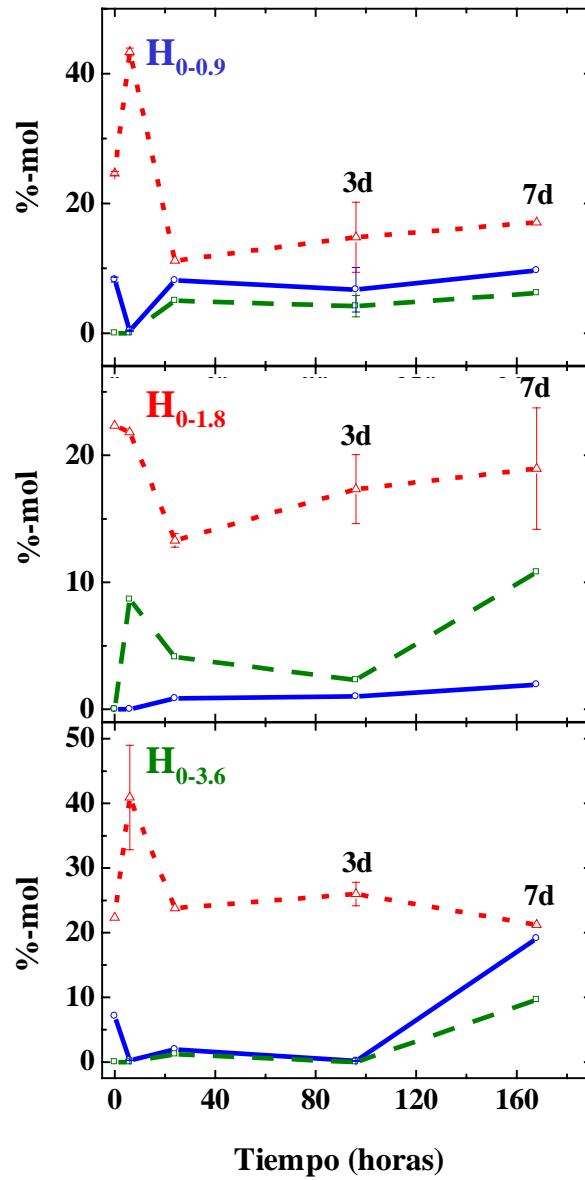


Figura 56: Análisis EDX de los híbridos de la serie H_0 a lo largo del ensayo.

—○— Ca, —△— Si, —□— P

IV.4. Comparación entre los híbridos y los vidrios sol-gel

Las piezas de híbridos en los sistemas CaO–SiO₂–PVAL y CaO–SiO₂–P₂O₅–PVAL se obtuvieron en forma de monolitos mediante un procedimiento basado en el que se empleó para la síntesis de los vidrios bioactivos. En este caso, las cantidades de PVAL seleccionadas (0.9, 1.8 y 3.6 % en masa) se disolvieron previamente en las cantidades de agua calculadas para la síntesis de los materiales. La adición de PVAL hizo posible la obtención de los híbridos como monolitos en unas condiciones en las que los vidrios sol-gel se fracturaban durante el secado.

Debido a la presencia del componente orgánico, la máxima temperatura de calentamiento para el procesado de los híbridos fue 60°C (Figura 48) considerablemente menor que la de la síntesis de los vidrios sol-gel (700°C). Como consecuencia de ello, se detectaron en los híbridos los grupos H₂O y NO₃⁻, procedentes del precursor de CaO, mediante IRTF (Figura 52). El análisis elemental confirmó la presencia de un 5.7 % de nitrógeno en los híbridos. Sin embargo, por IRTF, se comprobó que estos grupos NO₃⁻ se eliminaron durante las primeras etapas de los ensayos *in vitro* (Figura 52).

El análisis ATG permitió determinar un contenido en agua en los híbridos del 17 % en masa (Figura 50). Esta técnica permitió cuantificar los NO₃⁻ y el PVAL en los híbridos, que se descomponen en el mismo intervalo de temperatura. Ya que los híbridos preparados se basaron en los vidrios con 25 %-moles de CaO, añadidos como nitrato de calcio, todos deben contener la misma cantidad de NO₃⁻, mientras que el porcentaje de PVAL es diferente para cada composición (ver Tabla XII). Por tanto, la segunda pérdida de masa observada por ATG, 24 % para todas las composiciones de

híbridos, debe ser asignada principalmente a la eliminación de nitratos. Este resultado concuerda con las cantidades nominales de CaO y PVAL (Tabla XII) así como con los datos de análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno.

Por otra parte, el análisis de carbono, hidrógeno, nitrógeno reveló un contenido en carbono superior al esperado para los híbridos cuaternarios CaO–SiO₂–P₂O₅–PVAL. Esto podría atribuirse a una hidrólisis incompleta del TEP, fuente de P₂O₅, durante la síntesis, haciendo que parte de los grupos etoxi (–O–CH₂–CH₃) permanezcan en los híbridos.

La presencia de PVAL modificó las propiedades texturales de los materiales, haciendo que la S_{BET} y la porosidad de los híbridos disminuyan con respecto a los vidrios sol-gel con composición idéntica pero sin PVAL. En realidad, a diferencia de los vidrios sol-gel todos los híbridos mostraron superficies lisas antes de su inmersión en SBF (Figura 53).^{108,109}

IV.5. Comportamiento *in vitro* de los híbridos en SBF estático

Tabla XIV: Bioactividad *in vitro* de los híbridos. Tiempo al que se detectó la capa de apatita.

Híbrido	Formación de apatita	Tiempo (días)
H_{0-0.9}	Sí	1
H_{0-1.8}	Sí	1
H_{0-3.6}	Sí	1
H_{2.5-0.9}	Sí	4
H_{2.5-1.8}	Sí	7
H_{2.5-3.6}	No	-
H_{5-1.8}	No	-
H_{5-3.6}	No	-

La Tabla XIV muestra cuáles de los híbridos estudiados reaccionan con el SBF y forman apatita sobre su superficie, es decir, presentan bioactividad *in vitro*. Se ha encontrado una relación entre las composiciones de los híbridos y su bioactividad. En el caso de los híbridos sin P₂O₅ basados en el vidrio sol-gel **S75** (híbridos **H₀**) la presencia de PVAL aumentó la bioactividad. Así, para el vidrio **S75**, se necesitaron 7 días en SBF para detectar claramente la capa de apatita (Figuras 13 y 14) mientras que para los híbridos **H₀** la capa se detectó tras 1 día de ensayo (Figuras 52 y 53).

A medida que aumentó el contenido en P₂O₅ (series **H_{2.5}** y **H₅** basadas respectivamente en vidrios sol-gel con 2.5 y 5% en moles de P₂O₅) se observaron dos efectos: una disminución de la bioactividad y una mayor dificultad para sintetizar los híbridos. En este sentido, no fue posible obtener el **H_{5-0.9}** aunque se intentó repetidas veces, pero en todos los casos se produjo una precipitación indeseada durante la preparación del sol.

Por otra parte, la bioactividad de los materiales se ha relacionado con su velocidad de degradación que como se ha visto, depende de la composición. Así, cuando el híbrido se disuelve demasiado rápido, no será posible la formación de la capa CHA sobre su superficie.

Dado que estos materiales híbridos orgánico-inorgánico sufren una disolución muy pronunciada mientras se está formando la capa tipo apatita, su comportamiento *in vitro* resulta realmente complejo. Ambos procesos de disolución y formación de la capa son simultáneos por lo que, durante los primeros instantes, se producen marcadas fluctuaciones tanto de la superficie de los híbridos como de la disolución. A partir del primer día de ensayo, los híbridos cesaron de disolverse lo que facilitó la formación de la capa de fosfato de calcio, dando lugar a pequeños cristales con estructura tipo apatita.

Considerando en conjunto los resultados de bioactividad y degradación en condiciones *in vitro*, se ha encontrado una relación entre la composición de los híbridos y su comportamiento bioactivo y degradativo. Mientras que, tanto la degradabilidad como la bioactividad son también interdependientes. Esta relación se ha esquematizado en la Figura 57.^{108,109}

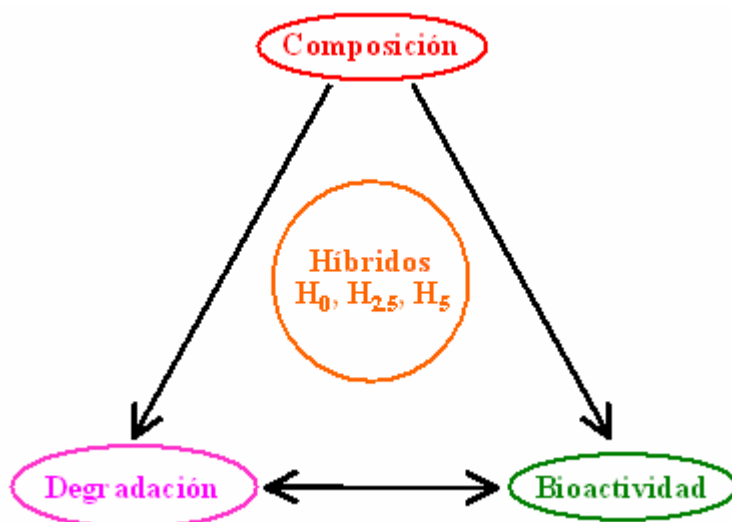


Figura 57: Esquema que indica que en los híbridos estudiados la composición, bioactividad y degradación están relacionadas.

IV.6. PVAL como inductor de porosidad en vidrios sol-gel

Como se ha visto, la porosidad de los vidrios sol-gel juega un papel esencial en su bioactividad. Por ello, y dada la fácil eliminación del PVAL, por ejemplo por medios térmicos, se ha estudiado la textura de los vidrios sol-gel obtenidos tras la eliminación del PVAL de los híbridos preparados.

En la Tabla XV se muestran las propiedades texturales determinadas por adsorción de N₂ de los vidrios preparados tratando los híbridos térmicamente (3 horas a 700°C) para eliminar el PVAL. Se incluyen las propiedades texturales de los vidrios sol-gel **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5**.

Tabla XV: Propiedades texturales de los vidrios sol-gel **S75**, **S72.5P2.5** y **S70P5** y de los obtenidos por tratamiento térmico de los híbridos. (*) Denota muestra tratada a 700°C para eliminar el PVAL.

Vidrio	PVAL (%-masa)	S _{BET} (m ² /g)	V _p (ml/g)	D _p (nm)
S75	0	133	0.520	10.7
H_{0-0.9} *	0.9	134	0.305	5.1
H_{0-1.8} *	1.8	139	0.211	3.9
H_{0-3.6} *	3.6	168	0.223	3.6
S72.5P2.5	0	153	0.420	8.7
H_{2.5-0.9} *	0.9	245	0.161	1.8
H_{2.5-1.8} *	1.8	229	0.167	3.2
H_{2.5-3.6} *	3.6	265	0.189	3.3
S70P5	0	327	0.430	4.0
H_{5-1.8} *	1.8	254	0.219	3.6
H_{5-3.6} *	3.6	220	0.201	3.7

Como puede observarse, la eliminación del PVAL de los híbridos **H₀** y **H_{2.5}** produjo un aumento de la S_{BET} y una disminución del volumen de poro, V_p. Para la serie **H₅** ambos valores, S_{BET} y V_p, disminuyeron con respecto al del vidrio **S70P5** obtenido por el método de síntesis habitual. Además, en todos los casos se observó una tendencia a la disminución del diámetro de poro, D_p, al aumentar el contenido en PVAL, si bien se observaron algunas irregularidades en los vidrios **H_{2.5}***

Estos resultados permiten proponer una nueva aplicación para híbridos basados en vidrios sol-gel y PVAL que consiste en su utilización como precursores para la obtención de vidrios sol-gel con porosidad controlada donde el PVAL, que se eliminaría por tratamiento térmico, actuaría como agente porógeno.

Capítulo V: Resumen

V.1. Síntesis, caracterización y bioactividad *in vitro* de vidrios sol-gel

Se han obtenido y caracterizado 3 vidrios sol-gel con un 25 %-mol de CaO y con contenidos de SiO₂ + P₂O₅ (en %-mol): 75 + 0 (**S75**) 72.5 + 2.5 (**S72.5P2.5**) y 70 + 5 (**S70P5**) y se ha estudiado su comportamiento en un fluido corporal simulado (SBF). Se ha analizado la influencia de la composición de los vidrios en sus propiedades texturales (superficie específica y porosidad) y en su comportamiento *in vitro*. En los vidrios **S72.5P2.5** y **S70P5** se detectaron pequeños núcleos de fosfato. Además, la porosimetría de Hg y la adsorción de N₂ mostraron que al aumentar el P₂O₅ en los vidrios, aumentó la superficie específica, mientras que disminuyeron el volumen de poro y el diámetro de poro. Estas variaciones pueden atribuirse a los cambios estructurales producidos por el P₂O₅ que se une al CaO formando núcleos de fosfato de calcio, lo que disminuye la cantidad de este elemento capaz de interactuar con la red de sílice.

Los estudios *in vitro* en **SBF estático** mostraron que las tres composiciones son bioactivas, ya que en todos los casos, se formó una capa de apatita tras 7 días en SBF. Sin embargo, la velocidad de las dos etapas en que puede dividirse la formación de la capa (i) formación de fosfato de calcio amorfo, (ii) cristalización de CHA, fue distinta para cada vidrio. **S75** presentó la reactividad inicial más alta pero la velocidad menor de cristalización de CHA. Estas diferencias se han justificado basándose en la presencia de pequeños cristales de fosfato de calcio en los vidrios con fósforo, **S72.5P2.5** y **S70P5** que actúan como núcleos de cristalización de CHA. Sin embargo, al unirse al fósforo, hay menos calcio en la red vítrea capaz de liberarse a la disolución. Ello disminuiría la concentración de grupos Si-OH en la superficie del vidrio durante los primeros instantes de inmersión y justificaría la menor reactividad inicial de los vidrios con fósforo manifestada en la más lenta formación de la capa de fosfato de calcio amorfo.

Por otra parte, el espesor de la capa CHA tras 7 días de inmersión disminuyó al aumentar el P_2O_5 en los vidrios, lo que también se ha atribuido a la disminución del calcio en la red vítrea capaz de liberarse al SBF.

V.2. Reactividad de los vidrios en nuevos protocolos *in vitro*

La reactividad de los tres vidrios sol-gel se evaluó en tres protocolos *in vitro*, más complejos que **SBF estático**, pero que simulan mejor las condiciones fisiológicas. En el primero, **SBF dinámico**, se renueva continuamente la disolución de ensayo. En el segundo, plasma inorgánico carbonatado simulado (**CSIP**) un burbujeo constante de CO_2/N_2 produce el tampón fisiológico CO_2/HCO_3^- , evitando la utilización del TRIS y permitiendo alcanzar una concentración fisiológica de HCO_3^- en disolución (24-27 mM). En el tercero, **SBF + alb**, el SBF se enriquece con albúmina, la proteína mayoritaria en el plasma.

En **SBF dinámico**, la capa CHA que se formó sobre **S72.5P2.5** fue más gruesa (6 vs. 2 μm) y tardó menos tiempo en cristalizar que en **SBF estático** (3 días frente a 4 días). En **CSIP**, se observó una velocidad de cristalización de CHA mayor (1 día frente a 4 días en **SBF estático**) pero la capa de CHA fue más delgada que en **estático** (1 vs. 2 μm).

Por otra parte, el protocolo **SBF + alb** ha permitido estudiar la influencia de la albúmina, en el comportamiento *in vitro* de los vidrios. Los estudios cinéticos de adsorción de albúmina sobre los vidrios demostraron que ésta tiene lugar en tiempos muy cortos (1 a 3 minutos) y con diferencias pequeñas entre los tres vidrios, lo que se ha atribuido a sus composiciones, muy similares, en particular al mismo contenido en calcio. La cristalización de apatita no se produjo tras 7 días en **SBF + alb**, lo cual demuestra que la albúmina dificulta la cristalización de CHA.

V.3. Biocompatibilidad de los vidrios en cultivos de osteoblastos

Se ha analizado la biocompatibilidad de los vidrios sol-gel antes y después de recubrir por una capa de CHA formada tras sumergirlos 7 días en **SBF estático**. Se han estudiado la **adhesión**, **extensión** y **proliferación** celular utilizando osteoblastos de rata. Las células se adhirieron a los tres vidrios sin tratar pero mostraron mayor eficiencia en el de mayor contenido en fósforo, **S70P5**. La formación de la capa CHA mejoró significativamente este proceso (1.7 veces). En todos los casos, la **adhesión** dio paso a la **extensión** celular en la superficie de los materiales, adoptando las células una morfología plana y con diversos filopodios. Se estudió la actividad mitótica de los osteoblastos cultivados sobre los vidrios sol-gel, siendo 2-4 veces mayor sobre la capa CHA. Por tanto, los vidrios sol-gel son biocompatibles pero su biocompatibilidad aumenta tras inducir la formación de una capa de CHA. Tras el cultivo de osteoblastos a largo plazo sobre los materiales sin recubrir no se detectó claramente la presencia de una capa de apatita lo que se explicó por el efecto inhibitorio de las proteínas que se encuentran en el medio de cultivo en una concentración muy alta.

V.4. Híbridos orgánico-inorgánico basados en vidrios sol-gel y polialcohol vinílico

Se han obtenido híbridos orgánico-inorgánico CaO–SiO₂–PVAL y CaO–P₂O₅–SiO₂–PVAL en forma de monolitos y se han caracterizado antes y después de la inmersión en SBF estático. Los híbridos se obtuvieron adicionando PVAL (0.9, 1.8 y 3.6 % en masa) a tres vidrios sol-gel CaO–P₂O₅–SiO₂ con 25 %-mol de CaO y 0, 2.5 y 5 %-mol de P₂O₅ respectivamente. Se analizó la influencia de las cantidades de PVAL y P₂O₅ en la posibilidad de obtener monolitos, en sus propiedades texturales y en su comportamiento *in vitro*. El PVAL favoreció la síntesis de monolitos bioactivos. Al aumentar el P₂O₅ se dificultó la síntesis de híbridos sin fracturar y se disminuyó su bioactividad *in vitro*. Además, al aumentar el contenido de PVAL y P₂O₅, aumentó la degradación *in vitro* de los híbridos. Así, los híbridos con los mayores contenidos de ambos componentes mostraron una degradación tan alta en SBF que se impidió la formación de la capa de CHA. Por otra parte, estos híbridos pueden ser precursores de vidrios sol-gel con propiedades texturales predeterminadas ya que el PVAL se elimina fácilmente por tratamiento térmico. Es decir, el PVAL puede actuar como agente porógeno.

Capítulo VI: Conclusiones

1. Se han sintetizado tres vidrios sol-gel, que presentaron bioactividad *in vitro*: uno de composición 25%CaO–75%SiO₂ (% en moles) y los otros dos sustituyendo respectivamente un 2.5% y un 5% del SiO₂ por P₂O₅.
2. Los vidrios presentaron distinta velocidad de formación de carbonato hidroxiapatita (CHA) en **SBF estático**. El vidrio sin fósforo fue el más rápido en la formación del fosfato de calcio amorfo inicial pero el más lento en la cristalización de CHA.
3. El P₂O₅ en los vidrios se une al CaO formando pequeños núcleos cristalinos de fosfato de calcio. Con ello disminuye el calcio en la red vítrea, lo que aumenta la superficie específica y disminuye el diámetro y el volumen de poro en los vidrios.
4. La unión P₂O₅–CaO justifica las variaciones en la velocidad de formación de CHA y la disminución del espesor de la capa al aumentar el P₂O₅:
 - El vidrio sin fósforo tiene más calcio en la red para liberar al SBF, lo que justifica su mayor reactividad inicial y el mayor espesor de la capa formada.
 - En los vidrios con fósforo los pequeños cristales de fosfato de calcio en el vidrio actúan como núcleos de cristalización de la CHA acelerando dicho proceso.
5. Para evaluar la potencialidad de tres nuevos protocolos *in vitro*, más complejos que el tradicional **SBF estático**, pero que simulan mejor las condiciones fisiológicas, se analizó la reactividad de los vidrios en **SBF dinámico**, **CSIP** y **SBF + alb**:
 - En **SBF dinámico** se obtuvo la capa de fosfato de calcio más gruesa y con menor relación molar Ca/P.
 - En **CSIP** se produjo la cristalización de CHA más rápida y la capa más delgada.

- En **SBF + alb** se produjo una adsorción de albúmina sobre los tres vidrios casi instantánea. En todos los casos, se detectó rápidamente el fosfato amorfo inicial pero la presencia de la proteína inhibió la cristalización de CHA.
6. Se han realizado cultivos de osteoblastos sobre los vidrios antes y después de inducir en ellos la formación de CHA en **SBF estático**. En todos los casos se observó una buena **adhesión, extensión y proliferación** celular, por lo que los vidrios pueden considerarse biocompatibles.
 7. La biocompatibilidad de los vidrios mejoró notablemente al aumentar el P_2O_5 y mucho más tras inducir la formación de una capa de CHA sobre su superficie.
 8. Tras 6 semanas de cultivo de osteoblastos sobre los vidrios no se detectó claramente la cristalización de CHA. Ello puede relacionarse con el efecto inhibitorio de las proteínas, muy abundantes en el medio de cultivo, en dicha cristalización.
 9. Se han obtenido híbridos $CaO-SiO_2-PVAL$ y $CaO-SiO_2-P_2O_5-PVAL$ en forma de monolitos. El PVAL facilitó la obtención de monolitos, mientras que el P_2O_5 dificultó la síntesis de los híbridos.
 10. El incremento del contenido de PVAL y P_2O_5 en los híbridos disminuyó el área superficial y la porosidad y aumentó su degradación en SBF.
 11. El PVAL incrementó la bioactividad en SBF de los híbridos basados en el vidrio sin fósforo. Sin embargo, altas cantidades de PVAL en los híbridos con P_2O_5 produjeron una degradación *in vitro* de los híbridos muy elevada, sin lograrse un comportamiento bioactivo de los mismos.
 12. Los híbridos pueden utilizarse como precursores de vidrios sol-gel con porosidad predeterminada tras la eliminación térmica del PVAL.

Capítulo VII: Apéndices

EL MÉTODO *SOL-GEL* PARA LA SÍNTESIS DE MATERIALES

A.1. Introducción

El método *sol-gel* puede utilizarse para la síntesis de muchos tipos de materiales. El método comienza con la preparación de una suspensión coloidal, *sol*, que evoluciona hasta convertirse en un sólido continuo embebido en un líquido, *gel*, que se trata térmicamente para obtener un material sólido.¹¹²

El proceso *sol-gel* se utiliza para sintetizar cerámicas y vidrios de alta pureza y homogeneidad que posean unas propiedades texturales (superficie específica y porosidad) determinadas. Asimismo, el proceso permite sintetizar materiales híbridos orgánico-inorgánico ya que las bajas temperaturas que utiliza preservan la integridad del polímero orgánico. Por este proceso se han obtenido gran diversidad de materiales en formas muy variadas: partículas, fibras, recubrimientos, películas delgadas, monolitos, membranas porosas, etc.

Las partículas coloidales del *sol* tienen un tamaño comprendido entre 1 y 1000 nm, por lo que entre ellas predominan las fuerzas de corto alcance (Van der Waals y electrostáticas) sobre las gravitacionales, quedando suspendidas en la matriz líquida. La estabilidad de un coloide depende de la resistencia a la agregación de las partículas. Para la obtención del *sol* se pueden utilizar como precursores sales inorgánicas o alcóxidos metálicos. Una vez obtenido el *sol*, se deja en reposo para que puedan tener lugar los procesos de *hidrólisis* y *policondensación* que conducen a la formación del *gel*. Posteriormente, se somete al *gel* a diversos tratamientos térmicos para obtener el material con las propiedades deseadas.^{58,112}

A.2. Etapas del proceso *sol-gel*

A continuación se describen las etapas del proceso *sol-gel* poniendo como ejemplo la formación de una red de sílice a partir de un alcóxido de silicio, de fórmula general $\text{Si}(\text{OR})_4$, donde R es un grupo alquilo (metilo, etilo, etc...). En el caso de esta tesis, el precursor utilizado en todos los casos fue TEOS, es decir $\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_3$. Asimismo, en algunos casos, se añadió trietil fosfato $\text{PO}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ para que tras su hidrólisis se incorpore a la red mediante la condensación entre grupos $\text{P}-\text{OH}$ y $\text{Si}-\text{OH}$.

1. *Preparación del sol*
2. *Hidrólisis*
3. *Condensación*
4. *Gelificación*
5. *Envejecimiento*
6. *Secado*
7. *Estabilización y densificación*

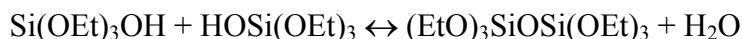
Influencia del precursor y la proporción de agua en la preparación del sol

Además de los efectos eléctricos y estéricos de los sustituyentes, debe tomarse en cuenta el carácter hidrofóbico o hidrofílico del precursor. Debido a la naturaleza hidrofóbica de los grupos etoxi, el TEOS y el agua son inmiscibles en todas las proporciones y es necesario adicionar un codisolvente para conseguir la miscibilidad que facilita la hidrólisis. Sin embargo, dado que el alcohol es un producto de la hidrólisis, si se mezclan mecánicamente el TEOS y el agua, con el tiempo se forma una sola fase.

La proporción estequiométrica agua/alcóxido para la hidrólisis completa es 4.



Sin embargo, puede emplearse una proporción menor ya que la reacción de condensación da lugar a la producción de agua:



Sin embargo, si la cantidad de agua es demasiado pequeña, la hidrólisis se retarda debido a la reducción de las concentraciones de reactivos. Análogamente, si se emplean cantidades de agua muy grandes se diluye el alcóxido y aumenta el *tiempo de gelificación*.¹¹² La velocidad de hidrólisis es máxima cuando la proporción molar agua/alcóxido es 8, por lo que ha sido la que se ha utilizado en esta tesis.⁵⁸

Influencia del catalizador en los procesos de hidrólisis y policondensación

Dado que uno de los objetivos de esta tesis es la obtención de vidrios e híbridos mediante el método *sol-gel* nos centraremos en el *mecanismo de la reacción sol-gel para obtener silicatos*. La primera etapa es la de hidrólisis que normalmente se lleva a cabo con catálisis ácida o básica. En este caso se ha utilizado catálisis ácida, más efectiva que la básica. En la Figura 58 se muestran los dos mecanismos de hidrólisis con catálisis ácida y básica.

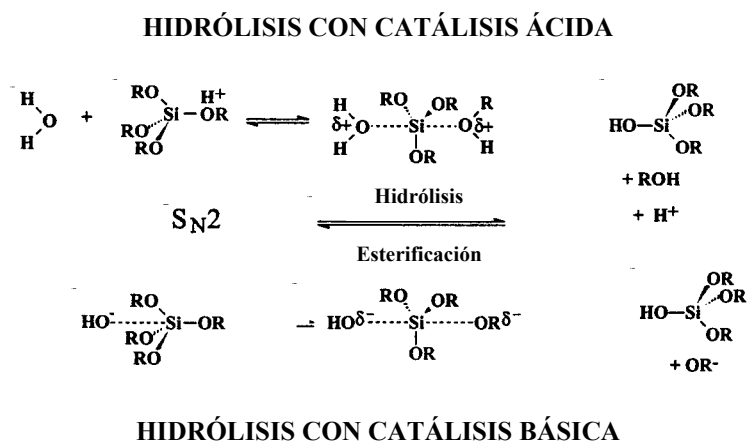


Figura 58: Mecanismos de hidrólisis *sol-gel* para obtener silicatos con catálisis ácida y básica.¹¹²

El *efecto de la catálisis* se puede analizar comparando la velocidad de reacción a diferentes valores de pH, teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de la sílice (donde las especies en equilibrio tienen carga neta cero) es a pH 2.2. Aunque ésta es sólo una medida aproximada de la velocidad relativa de hidrólisis, porque incluye la hidrólisis y la condensación, el tiempo para que se forme el *gel* da idea de las velocidades relativas. Como era de esperar, el *tiempo de gelificación* es mayor en el punto isoeléctrico y disminuye rápidamente en condiciones más ácidas o más básicas.¹¹²

Ambos mecanismos están sometidos a *efectos eléctricos* o inductivos y *estéricos*. En cuanto a los *efectos eléctricos*, los grupos alcoxi (OR) tienen un mayor efecto donador de electrones que los grupos hidroxilo (OH). Por tanto, para los estados de transición positivos de las reacciones ácido-base la velocidad disminuye a medida que se sustituyen los grupos alcoxi por hidroxilo. Por la misma razón, la estabilización de los estados de transición negativos de las reacciones ácido-base aumenta a medida que aumenta el número de grupos OH, dando lugar a reacciones más rápidas.¹¹²

En cuanto a los *efectos estéricos*, el tamaño de los grupos alcoxi ejerce una gran influencia: Cuanto mayor es el tamaño de dichos grupos, mayor es el impedimento estérico y más lenta es la reacción.¹¹²

Policondensación

La polimerización para formar enlaces siloxano ocurre mediante una reacción de condensación que produce agua o alcohol (como en la reacción siguiente):



Las reacciones inversas son la hidrólisis y la alcoholisis respectivamente. Como para la hidrólisis, la catálisis puede ser ácida o básica y en ambos casos, la reacción transcurre vía formación de un intermedio cargado mediante reacción de un protón o un ión hidroxilo, seguido de un ataque lento de una segunda especie de silicio sobre este intermedio tal y como se muestra en la Figura 59:

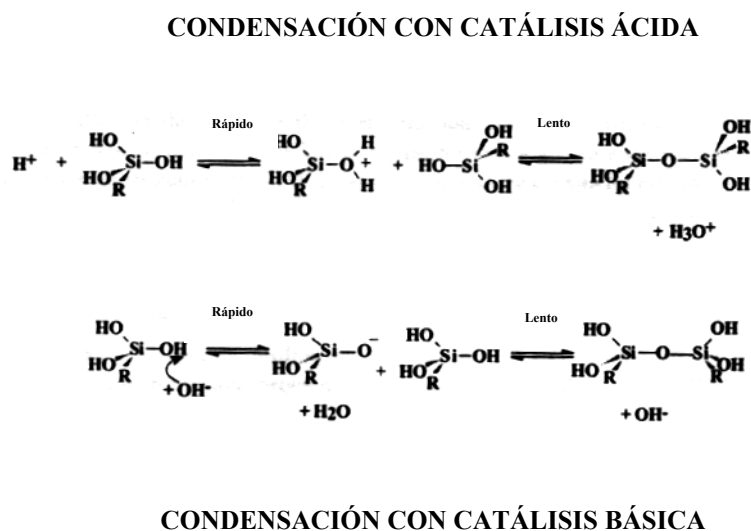


Figura 59: Mecanismos de condensación con catálisis ácida y básica.¹¹²

Como para la hidrólisis, las velocidades de reacción relativas de las diferentes especies dependen de los efectos estéricos y de la carga del estado de transición. En los sistemas reales, donde la hidrólisis y condensación suceden simultáneamente, la cinética global de reacción resulta muy compleja.

Gelificación

En la *gelificación*, las partículas de sílice producidas por *hidrólisis* y *condensación* se unen hasta formar un agregado gigante que ocupa todo el recipiente. En ese instante, a pesar de que la mezcla tiene una alta viscosidad, existen muchas partículas del *sol* como tales atrapadas en el agregado gigante aunque no unidas a él. Este *gel* inicial tiene una alta viscosidad pero baja elasticidad. En el *punto de gelificación* no hay intercambio de energía, ni ningún cambio químico; sólo un repentino incremento de la viscosidad. A partir de entonces, la *gelificación* continúa con más entrecruzamiento e inclusión de partículas *sol* aisladas, dando lugar a un aumento de la elasticidad.¹¹²

Envejecimiento

Los estudios de RMN de muestras gelificadas muestran un incremento gradual en el número de especies Q^3 y Q^4 (silicio unido vía 4 puentes de oxígeno a otros 3 ó 4 átomos de silicio) debido a entrecruzamiento vía reacciones de condensación de los grupos hidroxilo en los poros de la superficie. Este proceso puede continuar durante meses para muestras a temperatura ambiente. El efecto es el aumento de rigidez y la contracción de la muestra. La reducción de volumen ocurre porque se forman nuevos enlaces donde antes había sólo interacciones débiles entre los grupos hidroxilo y alcoxi. Esta reducción conduce a la expulsión de líquido de los poros del *gel*, de modo que las

muestras en recipientes herméticos cambian gradualmente de aspecto de *geles* homogéneos a monolitos reducidos transparentes inmersos en líquido. Este proceso se conoce como *sinéresis*. Otro proceso asociado al envejecimiento es la *maduración*. En este proceso, se disuelve material desde la superficie de partículas grandes y se deposita en los “cuellos” inicialmente estrechos que unen las partículas. Un efecto final del envejecimiento puede ser la transformación de fase. Esta situación indeseable puede evitarse modificando la velocidad de reacción (por ejemplo, por dilución o control de pH). De lo ya expuesto se deduce que las consecuencias del envejecimiento son:

- a) La mejora de las propiedades del material.
- b) El proceso de envejecimiento puede controlarse variando el pH, temperatura, presión, medio líquido y composición de la mezcla precursora consiguiendo así una optimización.

Secado

Al secarse, un *gel* encogerá una cantidad igual al volumen de agua o de otro líquido que se ha evaporado. Esta fase puede ocurrir sólo en *geles* que son aún muy flexibles y capaces de adaptarse a un volumen reducido. Durante el *secado*, la estructura de los *geles* se vuelve más compacta y el entrecruzamiento adicional da lugar a una rigidez creciente. En el *punto crítico*, el *gel* se ha vuelto demasiado rígido como para soportar más reducción a medida que el líquido se evapora. En este punto el líquido retrocede dentro de los poros de la estructura del *gel*. Debido a su tensión superficial y al pequeño tamaño de los poros, se generan grandes tensiones. A menos que el *gel* se haya preparado cuidadosamente para tener un entrecruzamiento óptimo, así como un cuidadoso envejecimiento, se fracturará debido a estrés capilar. Como efecto del *secado*,

algunas muestras tienden a desarrollar superficies cóncavas. Para evitar la fractura de los *geles* puede realizarse un secado supercrítico, liofilización, etc.

Estabilización y densificación

El tratamiento térmico necesario para la estabilización de los vidrios para que puedan manejarse en condiciones ambiente recibe el nombre de *estabilización*. El calentamiento de los xerogeles produce una disminución del número de hidroxilos eliminados por condensación, reduciendo la energía libre del gel y aumentando su estabilidad. Como consecuencia de ello, tiene lugar un aumento de la viscosidad del xerogel y una pérdida de peso. Asimismo, a temperaturas todavía superiores tiene lugar la *densificación* en la que se produce una reducción de volumen y se elimina la porosidad obteniéndose vidrios y cerámicas densas.¹¹²

A.3. Ventajas y desventajas del proceso sol-gel

Las principales *ventajas* son:

1. Las bajas temperaturas a las que se realizan todas las etapas (excepto en la estabilización y densificación). Así se minimiza la degradación térmica y se consigue una gran pureza.
2. La posibilidad de preparar materiales muy porosos y nanocristalinos.
3. Poder controlar, modificando los precursores, las velocidades de hidrólisis y condensación, el tamaño de partícula, de poro, la porosidad y la estructura química del material final.
4. Mediante la regulación de las condiciones de secado y envejecimiento se consigue controlar el tamaño de poro y la resistencia mecánica.

5. Empleando precursores organometálicos que contienen ligandos orgánicos polimerizables se pueden obtener materiales que contengan redes poliméricas orgánicas e inorgánicas.
6. Las especies orgánicas atrapadas pueden servir como plantillas para la creación de poros con tamaño y forma controlados.
7. Dado que los precursores son líquidos, es posible obtener películas, fibras y monolitos sin necesidad de maquinaria o fundido.

En cuanto a las *limitaciones* hay que mencionar que los precursores son a menudo caros y sensibles a la humedad, limitando la producción a gran escala. El proceso requiere mucho tiempo. Aunque es evitable, es frecuente que se produzcan fracturas del material durante el secado.¹¹²

TECNICAS INSTRUMENTALES

Fluorescencia de rayos-X (FRX)

La composición de los vidrios sol-gel se analizó por FRX en un espectrómetro Bruker-AXS S4 Explorer del C.A.I. de difracción y fluorescencia de rayos-X de la U.C.M. El estudio se realizó en discos de 34 mm de diámetro que se prepararon compactando 10 g de muestra (tamaño de partícula > 63 μm).

Análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno

El contenido en C, H y N de los híbridos se llevó a cabo mediante análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno en el microanalizador elemental LECO CHNS-932 del C.A.I. de microanálisis elemental de la U.C.M. calentando hasta 1200°C.

Análisis termogravimétrico (ATG)

Por ATG se estudió la estabilidad térmica de las muestras. El estudio se llevó a cabo en una termobalanza Seiko Pyris Diamond. Unos 10 mg de muestra y de referencia, $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, se calentaron en crisoles de Pt a 5°C por minuto con corriente de aire de 100 ml/minuto. Los xerogeles de los vidrios sol-gel se calentaron desde 30°C hasta 1200°C. Para los híbridos orgánico-inorgánico, la temperatura final fue 800°C.

Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

El análisis por CBD se llevó a cabo en un calorímetro Seiko SSC calentando unos 10 mg de muestra desde 30 a 550°C a 1°C/minuto. Como referencia se empleó $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. El crisol que contenía la muestra se cerró herméticamente aunque perforando un pequeño agujero para que permitiera la salida de los gases.

Difracción de rayos-X (DRX)

Por DRX se estudió la estructura y la cristalinidad de las muestras en un difractor Philips X'Pert MPD del C.A.I. de difracción de rayos-X de la UCM, cuyas condiciones de trabajo fueron 40 KV y 55 mA. Como fuente de rayos-X, se empleó un cátodo de cobre, empleando la radiación CuK_α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Para analizar la superficie de los materiales, se empleó incidencia rasante, manteniendo constante el ángulo de incidencia del haz de rayos-X ($\theta_0 = 0.5$ grados) y moviendo sólo el detector. En los demás casos se empleó la geometría de Bragg-Brentano en la que se mueven la muestra un ángulo θ y el detector 2θ .

En ambos casos el intervalo estudiado fue $2\theta = 4-80$ grados. El paso de ángulo fue de 0.04 grados y cada paso de ángulo se mantuvo 1s.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF)

Se llevó a cabo en un espectrómetro Nicolet Nexus empleando un accesorio de reflectancia difusa (DRIFT) Graseby Specac[®] y un accesorio de transmisión total atenuada (ATR) Golden-Gate[®] de una sola reflexión con ventana de diamante. En reflectancia difusa, antes de recoger los espectros se buscó que la señal recogida fuese máxima con ayuda de un tornillo regulador. En ATR, se ejerce presión sobre la muestra ajustando un tornillo hasta que la intensidad del espectro recogido en 1 barrido sea máxima.

En ambos casos se analizó directamente la superficie de los materiales sin que fuera necesario preparar una pastilla de KBr. El número de barridos fue 64 y la resolución 4 cm^{-1} .

Microscopia electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia por dispersión de energía de rayos-X (EDX)

Por MEB se estudió la morfología y la estructura superficial de los materiales. Además, mediante el detector de rayos-X acoplado al microscopio electrónico (EDX) se obtuvo información semicuantitativa de la composición química de la muestra. Las imágenes MEB se registraron tanto utilizando el detector de electrones secundarios, más sensible a la topografía de la muestra, como el de electrones retrodispersados en aquellos casos en que no era posible precisar los límites de la capa CHA.

Los estudios se realizaron en un microscopio JEOL 6400 con un accesorio LINK AN 10000. Tanto las piezas de vidrio como las de híbrido se montaron pegándolas en soportes. A continuación se metalizaron a vacío con oro un metalizador Balzers SCD 004 (para las imágenes MEB) y con grafito (para el análisis EDX) ya que la señal del Au solapa con la del P, en un Balzers Union Med 010.

Para los estudios de biocompatibilidad mediante cultivos celulares, las células adheridas a las muestras se lavaron 4 veces con PBS y se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído en tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.4, durante 30 minutos a 4°C . La deshidratación se llevó a cabo mediante sustitución lenta de agua por una serie de soluciones de etanol cada vez más concentradas antes del punto crítico de secado (CPD)

para lo que se empleó un equipo CPD 030. Las muestras se montaron en soportes y se recubrieron a vacío con oro y se visualizaron por MEB.

Porosimetría de intrusión de Hg

La porosidad de las muestras para poros con un tamaño comprendido entre 3 y 3.6×10^5 nm, se midió en un porosímetro Micromeritics Autopore III 9420 Además se determinaron el porcentaje de porosidad y la densidad de los materiales sol-gel.

La porosimetría de mercurio se basa en la ley de capilaridad que gobierna la penetración de líquidos en poros pequeños. Esta ley, en el caso del Hg y de poros cilíndricos, está expresada por la ecuación de Washburn:^{113,114}

$$D = (1/P)4\gamma\cos\phi$$

donde D es el diámetro de poro, P es la presión aplicada, γ la tensión superficial y ϕ el ángulo de contacto. El volumen de mercurio, V, que penetra en los poros se mide directamente en función de la presión aplicada. La relación P-V permite caracterizar la estructura de los poros.

Los poros raramente son cilíndricos presentando irregularidades dando lugar a estructuras de cámara ampliada y tipo tintero. Esto da lugar al fenómeno de histéresis, es decir, las curvas P-V de intrusión y extrusión son diferentes.

Porosimetría de adsorción de N₂

A través de esta técnica se detectaron poros con tamaños comprendidos entre 0.3 y 300 nm en un equipo Micromeritics ASAP 2010. Previamente se desgasificaron las muestras durante 24 horas calentando a 100°C los vidrios sol-gel y a 60°C los híbridos derivados de estos vidrios.

En condiciones de equilibrio, la cantidad, x , de N₂ adsorbido (adsorbato) sobre una unidad de masa de un sólido (adsorbente) es función de la presión y temperatura. A temperatura constante se cumple la siguiente igualdad,

$$x = f(P/P_0)_T$$

donde P es la presión en equilibrio en el sólido y P_0 es la presión de saturación del gas a temperatura T .

La representación gráfica de x en función de P/P_0 se conoce como *isoterma de adsorción*. La forma de la isoterma depende de la textura del adsorbente. La mayoría de las isotermas se pueden agrupar en los 6 tipos de la Figura 60.⁸³

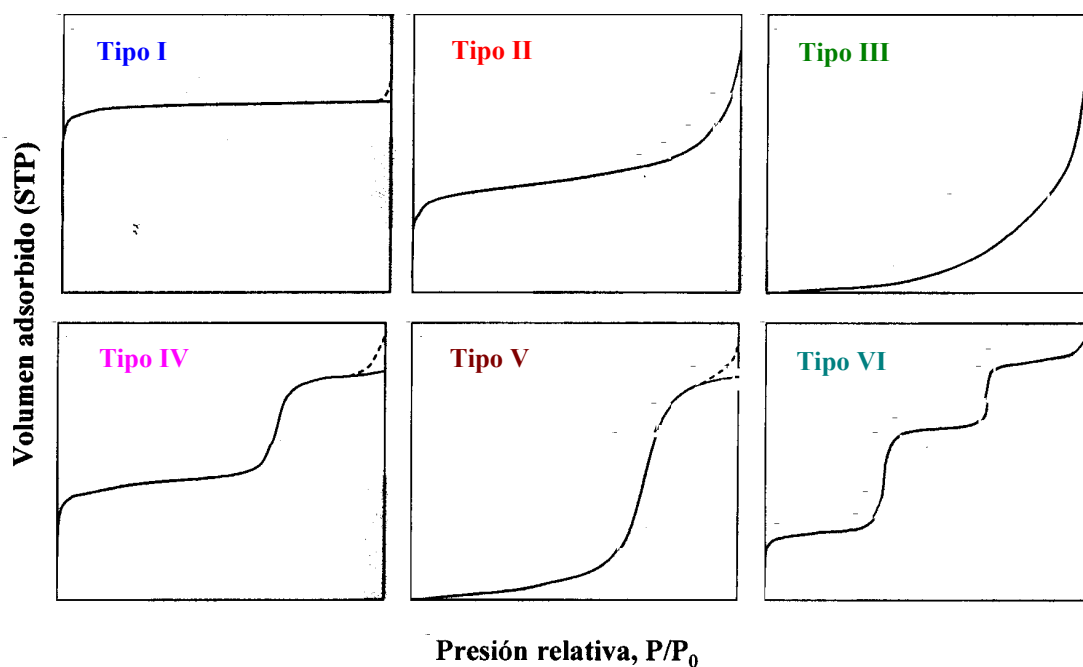


Figura 60: Tipos de isothermas de adsorción.

Las isothermas Tipo I son características en sólidos microporosos. Los tipos II y III se obtienen para sólidos no porosos con áreas superficiales muy elevadas o para materiales que presentan una distribución continua de meso y macroporos hasta presiones relativas próximas a la unidad. Las isothermas Tipo V y Tipo V se presentan en sólidos mesoporosos. Las isothermas Tipo VI son características de sólidos de superficies uniformes y distribuciones múltiples de mesoporos.

Frecuentemente, la retención en la superficie del material de cierta cantidad de gas tiene lugar a una presión relativa mayor durante la adsorción que en la desorción. Este fenómeno provoca la formación de un *ciclo de histéresis*.

La geometría y tamaño de los poros determina la forma del ciclo de histéresis. La Figura 61 muestra los cuatro tipos de ciclos de histéresis de la clasificación recomendada por la IUPAC.¹¹⁵

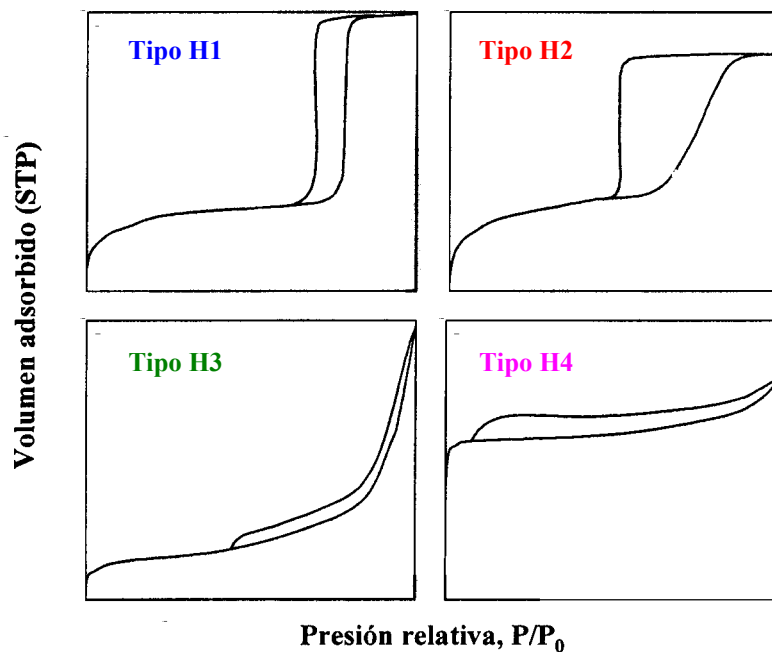


Figura 61: Tipos de ciclos de histéresis.

El área superficial se obtuvo aplicando el método BET⁸⁵ a la isoterma de adsorción de nitrógeno. La distribución de tamaño de poro se determinó mediante el método BJH⁸⁴ a partir de la rama de desorción de la isoterma.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SBF (FLUIDO CORPORAL SIMULADO)

1. Se lava todo el material con una disolución de HCl 1 N, detergente neutro y se enjuaga con agua bidestilada.
2. Se vierten unos 500 ml de agua bidestilada en un vaso de precipitados de Teflón®.
3. Se disuelven los reactivos, uno por uno, con agitación y en el orden dado en la Tabla XVI, controlando que no se forme ningún precipitado y que el pH no sobrepase un valor de 7.45 a 37°C.
4. Se ajusta la temperatura de la disolución a 37°C y el pH a 7.3-7.4 agitando la solución y neutralizando con la cantidad necesaria de HCl 1N.
5. Se vierte la disolución del vaso de Teflón® en un matraz aforado de 1 litro. Se enrasa.
6. Se transfiere la solución del matraz aforado a una botella de polietileno donde se conserva a menos de 8°C durante 1 mes como máximo.

Tabla XVI: Cantidades de reactivos para preparar 1 litro de SBF.

Orden	Reactivo	Cantidad
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.305 g
6	HCl 1N	40 ml
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6.057 g

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Publicaciones derivadas de este trabajo

1. M. Vallet-Regí, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, N. Olmo, J. Turnay, M. A. Lizarbe, “*In vitro* behaviour of bioactive CaO–P₂O₅–SiO₂ sol-gel glasses”, *Biology of the cell*, **93**, 325, (2001).
2. A. J. Salinas, **A. I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Bioactivity of three sol-gel glasses”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61** (4), 524, (2002).
3. N. Olmo, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, J. Turnay, M. Vallet-Regí, M. A. Lizarbe, “Bioactive sol-gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation”, *Biomaterials*, **24**, 3383, (2003).
4. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhães, R. N. Correia, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, “Ceramics *in vitro* mineralisation protocols: a supersaturation problem”, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 143, (2004).
5. A. J. Salinas, J. M. Merino, N. Hijón, **A. I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Bioactive organic-inorganic hybrids based on CaO–SiO₂ glasses”, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 481, (2004).
6. **A. I. Martín**, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, “Bioactive and degradable organic-inorganic hybrids”, *J. Eur. Ceram. Soc.* (En prensa).

Contribuciones a congresos

1. A. J. Salinas, A. Martínez, I. Izquierdo, **A. I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Preparation and study of bioactive sol-gel glasses”, Póster, **BioAvila 2000. I Iberian Congress on Biomaterials and Biosensors**, Ávila (España) 17-20 Septiembre 2000.
2. A. J. Salinas, **A.I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Bioactivity of three CaO–P₂O₅–SiO₂ glasses”, Póster, **FIGIPS Meeting in Inorganic Chemistry**, Barcelona (España) 17-20 Julio 2001.
3. M. Vallet-Regí, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, N. Olmo, J. Turnay, M.A. Lizarbe, “*In vitro* behaviour of bioactive sol-gel glasses”, Póster, **Microscopy 2001**, Barcelona (España) 3-7 Septiembre 2001.
4. **A. I. Martín**, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, P. A. A. P. Marques, M. C. Magalhães, R. N. Correia, “Apatite formation on a sol-gel glass at pH 7.3”, Póster, **17th European Society for Biomaterials Conference**, Barcelona (España) 11-14 Septiembre 2002.
5. P. A. A. P. Marques, M. C. Magalhães, R. N. Correia, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí “Mineralization of apatite α -TCP ceramics in different SBF media”, Póster, **17th European Society for Biomaterials Conference**, Barcelona (España) 11-14 Septiembre 2002.
6. **A. I. Martín**, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, “Bioactividad de biovidrios en soluciones conteniendo albúmina”, Póster, **XXIX Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química**, Madrid (España) 5-11 Julio 2003.

7. A. J. Salinas, N. Hijón, J.M. Merino, **A. I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Híbridos orgánico-inorgánico para implantes óseos”, Comunicación oral, **XXIX Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química**, Madrid (España) 5-11 Julio 2003.
8. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhães, R. N. Correia, **A. I. Martín**, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, “Ceramics *in vitro* mineralisation protocols: a supersaturation problem”, Póster, **Bioceramics 16**, Oporto (Portugal) 6-9 Noviembre 2003.
9. A. J. Salinas, J. M. Merino, N. Hijón, **A. I. Martín**, M. Vallet-Regí, “Bioactive organic-inorganic hybrids based on CaO–SiO₂ glasses”, Comunicación oral, **Bioceramics 16**, Oporto (Portugal) 6-9 Noviembre 2003.

Capítulo VIII: Bibliografía

1. D. F. Williams, en *Bone Engineering*, Ed: J. E. Davies em squared, Toronto, (2000), p. 577.
2. L. L. Hench, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1487, (1991).
3. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, 117, (1971).
4. M. Vallet-Regí, J. M. González-Calbet, *Prog. Solid State Ch.*, **32**, 1, (2004).
5. M. Pinilla, J. R. García-Berrocal, R. Ramírez-Camacho, J. Buján, E. Jorge, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **6**, 745, (1995).
6. B. A. Blencke, H. Brömer, K. Deutscher, *Med-Orthop. Technol.*, **95**, 144 (1975).
7. T. Peltola, V. Ääritalo, A. M. Haltia, M. Vehvitäinen, S. Areva, M. Jokinen, A. Yli-Urpo, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 159, (2003).
8. S-H. Rhee, J-Y Choi, H-M Kim, *Biomaterials*, **23**, 4915, (2002).
9. D. F. Williams en *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Ed: D. F. Williams, Liverpool University Press, Liverpool, (1998), p. 318.
10. M. J. Lysaght, N. A. Nguy, K. Sullivan, *Tissue Eng.*, **4 (3)**, 231, (1998).
11. V. J. Shirliff, L. L. Hench, *J. Mater. Sci.*, **38**, 4697, (2003).
12. M. Vallet-Regí, C. V. Ragel, A. J. Salinas, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1029, (2003).
13. C. G. Pantano, A. E. Clark, L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **57**, 412, (1974).
14. S. Falaize, S. Radin, P. Ducheyne, *J. Am. Ceram. Soc.*, **82**, 969, (1999).
15. J. P. Zhong, D. C. Greenspan, en *Bioceramics 11*, Ed: R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, World Scientific, Singapore, (1998), p. 415.
16. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 721, (1990).

17. P. Ducheyne, S. Brown, N. Blumenthal, L. L. Hench, A. Krajewski, G. Palavit, A. Ravaglioli, S. Steineman, S. Winderler, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **523**, 257, (1988).
18. T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohsuki, S. Sakka, T. Yamamura, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **3**, 79, (1992).
19. L. L. Hench, E. C. Ethridge, en *Biomaterials, An Interfacial Approach*, Academic Press, New York, (1982), pp. 139, 221.
20. Ö. H. Andersson, K. H. Karlsson, K. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, *Glastech. Ber.*, **61**, 300, (1988).
21. B. A. Blencke, H. Brömer, K. Deutcher, *J. Biomed. Mater. Res.*, **12**, 307, (1978).
22. T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, **60**, 260, (1982).
23. W. Vogel, W. Holland, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **26**, 527, (1987).
24. R. D. Rawlings, *J. Mater. Sci. Lett.*, **11**, 1340, (1992).
25. A. Martínez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, **12**, 3080, (2000).
26. C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 424, (2000).
27. R. P. del Real, S. Padilla, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 1, (2000).
28. D. Arcos, C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, *Biomaterials*, **22**, 701, (2001).
29. S. Padilla, R. P. del Real, M. Vallet-Regí, *J. Control. Release*, **83**, 343, (2002).
30. A. Rámila, R. P. del Real, R. Marcos, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **26**, 1195, (2003).
31. S. Ladrón de Guevara, C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, *Biomaterials*, **24**, 4037, (2003).
32. R. P. del Real, D. Arcos, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, **14**, 64, (2002).

33. D. Arcos, R. P. del Real, M. Vallet-Regí, *Biomaterials*, **23**, 2151, (2002).
34. C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, L. M. Rodríguez-Lorenzo, *Biomaterials*, **23**, 1865, (2002).
35. A. Rámila, S. Padilla, B. Muñoz, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, **14**, 2439, (2002).
36. J. Román, S. Padilla, M. Vallet-Regí, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 31, (2004).
37. I. Izquierdo-Barba, A. Asenjo, L. Esquivias, M. Vallet-Regí, *Eur. Inorg. Chem.*, 1608, (2003).
38. A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **21**, 13, (2001).
39. L. L. Hench, C. G. Pantano, P. J. Buscemi, D. C. Greenspan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 267, (1977).
40. Ö. H. Anderson, K. H. Karlsson, I. Kangasniemi, *J. Non-Cryst. Solids*, **119**, 290, (1990).
41. E. Schepers, P. Ducheyne, M. De Clercq, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 735, (1989).
42. Ö. H. Anderson, I. Kangasniemi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1019, (1991).
43. K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura, M. Oka, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **3**, 95, (1992).
44. R. Li, A. E. Clark, L. L. Hench, en *Chemical Processing of Advanced Materials*, Ed: L. L. Hench, J. K. West, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1992), p. 627.
45. P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo, K. De Groot, *Biomaterials*, **14**, 963, (1993).
46. M. M. Pereira, A. E. Clark, L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **78**, 2463, (1995).
47. M. M. Pereira, L. L. Hench, *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **7**, 59, (1996).

48. M. M. Pereira, A. E. Clark, L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 693, (1994).
49. M. Vallet-Regí, A. Rámila, *Chem. Mater.*, **12 (4)**, 961, (2000).
50. J. Pérez-Pariente, F. Balas, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, **12**, 750, (2000).
51. M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 560, (1999).
52. I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 243, (1999).
53. D. Arcos, D. C. Greenspan, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, **14 (4)**, 1515, (2002).
54. R. Li, A. E. Clark, L. L. Hench, *J. Appl. Biomater.*, **2**, 231, (1991).
55. M. Vallet-Regí, A. J. Salinas, J. Román, M. Gil, *J. Mater. Chem.*, **9**, 515, (1999).
56. J. Pérez-Pariente, F. Balas, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **12**, 750, (1999).
57. F. Balas, D. Arcos, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *J. Mater. Res.*, **16**, 1345, (2001).
58. C. J. Brinker, G. W. Sherer, en *Sol-Gel Science the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Ed: Academic Press, Inc. San Diego, (1990).
59. D. Arcos, D. C. Greenspan, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65 A (3)**, 344, (2003).
60. S. Falaize, S. Radin, P. Ducheyne, *J. Am. Ceram. Soc.*, **82**, 969, (1999).
61. I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51 (2)**, 191, (2000).
62. A. Rámila, M. Vallet-Regí, *Biomaterials*, **22 (16)**, 2301, (2001).
63. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhaes, R. N. Correia, *Biomaterials*, **24**, 1541, (2003).

64. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhaes, S. V. Dorozhkin, R. N. Correia, *Key Eng. Mater.*, **192-195**, 27, (2001).
65. P. Ducheyne, Q. Qiu, *Biomaterials*, **20**, 2287, (1999).
66. C. Loty, J. M. Sautier, M.T. Tan, M. Oboeuf, E. Jallot, H. Boulekbache, D. Greenspan, N. Forest, *J. Bone Miner. Res.*, **16 (2)**, 231, (2001).
67. T. Matsuda, J. E. Davies, *Biomaterials*, **8**, 275, (1987).
68. W. C. A. Vrouwenvelder, G.C. Groot, K. De Groot, *Biomaterials*, **13**, 382, (1992).
69. W. C. A. Vrouwenvelder, G.C. Groot, K. De Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 465, (1993).
70. W. C. A. Vrouwenvelder, G.C. Groot, K. De Groot, *Biomaterials*, **15**, 97, (1994).
71. M. Ohgaki, S. Nakamura, K. Yamashita, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 711, (2003).
72. H. Zreiqat, C. R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, C. Knabe, G. Shulze-Tanzil, G. M. Shakibaei, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 707, (2003).
73. T. V. Kumari, U. Vasudev, A. Kumar, B. Menon, *Trends Biomater. Artif. Organs.*, **15 (2)**, 37, (2002).
74. A. M. Moursi, A. V. Winnard, P. L. Winnard, J. J. Lannutti, R. R. Seghi, *Biomaterials*, **23 (1)**, 133, (2002).
75. I. D. Xynos, M. V. J. Hukkaken, J. J. Batten, I. D. Buttery, L. L. Hench, J. M. Polak, *Calcif. Tissue Int.*, **67**, 321, (2000).
76. L. Meseguer-Olmo, M. J. Ros-Nicolás, M. Clavel-Sáinz, A. Martínez-Marín, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Baños, A. Lax-Pérez, D. Arcos, C. V. Ragel, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61**, 458, (2002).

77. J. Gil-Albarova, R. Garrido-Lahiguera, A. J. Salinas, J. Román, A. L. Bueno-Lozano, R. Gil-Albarova, M. Vallet-Regí, *Biomaterials*, **25**, 4639, (2004).
78. S-H. Rhee, *Biomaterials*, **24**, 1721, (2003).
79. A. J. Salinas, A. I. Martín, M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61** (4), 524, (2002).
80. Ficha 24-33, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (hydroxylapatite), International Centre for Diffraction Data 1994. ©
81. J. C. Elliot en *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Ed. Elsevier, Amsterdam, (1994).
82. J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H. O. Ylänen, H. Hupa, *J. Non-Cryst. Solids*, **332**, 20, (2003).
83. S. Brunauer, L. S. Deming, W. S. Deming, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 172, (1940).
84. E. P. Barrett, G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 373, (1951).
85. S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309, (1938).
86. P. A. A. P. Marques, M. C. F. Magalhães, R. N. Correia, A. I. Martín, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 143, (2004).
87. P. A. A. P. Marques, A. P. Serro, B. J. Saramago, A. C. Fernandes, M. C. F. Magalhaes, R. N. Correia, *Biomaterials*, **24**, 451, (2003).
88. H. Zeng, K. K. Chittur, W. R. Lacefield, *Biomaterials*, **20**, 377, (1999).
89. M. Vallet-Regí, A. I. Martín, A. J. Salinas, N. Olmo, J. Turnay, M. A. Lizarbe, *Biology of the cell*, **93**, 325, (2001).
90. N. Olmo, A. I. Martín, A. J. Salinas, J. Turnay, M. Vallet-Regí, M. A. Lizarbe, *Biomaterials*, **24**, 3383, (2003).

91. D. A. Puleo, L. A. Holleran, R. H. Doremus, R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 711, (1991).
92. J. Turnay, N. Olmo, T. López-Conejo, M. A. Lizarbe, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **30 A**, 643, (1994).
93. T. López-Conejo, N. Olmo, J. Turnay, J. M. Navarro, M. A. Lizarbe, *Int. J. Cancer*, **67**, 668, (1996).
94. M. T. López-Conejo, N. Olmo, J. Turnay, I. López de Silanes, M. A. Lizarbe, *Oncology*, **62**, 371, (2002).
95. M. Vallet-Regí, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2**, 97, (2001).
96. C. Loty, J. M. Sautier, H. Boulekbache, T. Kokubo, H. M. Kim, N. Forest, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**, 423, (2000).
97. M. Vallet-Regí, A. M. Romero, C. V. Ragel, R. Z. LeGeros, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 416, (1999).
98. A. El-Grahanam, P. Ducheyne, I. M. Shapiro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 359, (1995).
99. J. Green, *Miner. Electrolyte Metab.*, **20**, 16, (1994).
100. A. S. G. Curtis, C. D. W. Wilkinson, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1313, (1998).
101. A. S. G. Curtis, B. Casey, J. O. Gallagher, D. Pasqui, M. A. Wood, *Biophys. Chem.*, **94**, 275, (2001).
102. D. E. Maslow, L. Weiss, *J. Cell Sci.*, **21**, 219, (1976).
103. K. Browsers, B. Keller, B. Randolph, D. Wick, C. Michaels, *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, **7**, 302, (1992).
104. P. J. Marie, A. Lomri, A. Sabbagh, M. Basle, *In vitro Cell Dev. Biol.*, **25**, 373, (1989).

105. B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, Z. Schawrtz, *Biomaterials*, **17**, 137, (1996).
106. B. Labat, A. Chamson, J. Frey, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1397, (1995).
107. A. H. Reddi en *Bioceramics II*, Ed: R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, World Scientific, New York, (1998), p. 9.
108. A. J. Salinas, J. M. Merino, N. Hijón, A. I. Martín, M. Vallet-Regí, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 481, (2004).
109. A. I. Martín, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *J. Eur. Ceram. Soc.* (En prensa).
110. J. D. Cho, W. S. Lyoo, S. N. Chvalum, J. Blackwell, *Macromolecules*, **32**, 6236, (1999).
111. E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon en *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*, Ed: Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, (1998), p. 299.
112. J. D. Wright, N. A. J. M. Sommerdijk en *Sol-Gel Materials Chemistry and Applications*, Advanced Chemistry Texts Vol. 4, Ed: Gordon and Breach Science Publishers, Liverpool, (2001).
113. R. S. Mikhail, E. Robens en *Microstructure and Thermal Analysis of Solid Surfaces*, Ed: Wiley, Chichester, 1983, p. 160.
114. E. W. Washburn, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **7**, 115, (1921).
115. K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, *Pure Appl. Chem.*, **57**, 603, (1985).