



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
Campo de conocimiento: Odontológicas Básicas

Estudio de la formación de la capa de apatita en un vidrio bioactivo sintetizado por técnica sol-gel, usando como material base la ceniza de cáscara de arroz.

Tesis
que para optar por el Grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:
Miriam Marín Miranda

Tutor:
Dra. Norma Angélica Sánchez Flores
CCADET, UNAM

Comité Tutorial:
Dr. Jesús Arenas Alatorre, IF, UNAM
Dr. José Manuel Saniger Blesa, CCADET, UNAM

Ciudad de México. Diciembre 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Miriam Marín Miranda agradece a:

CONACyT por el apoyo financiero.

Por su colaboración tecnológica en el análisis de las muestras por:

- FRX, Mtra. Patricia Girón del Instituto de Geología de la UNAM,
- DRX, Mtra. Adriana Tejeda Cruz del Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM,
- BET, I.Q. Viridiana Maturano de CCADET UNAM,
- Reología Dra. María Soledad Córdova Aguilar de CCADET UNAM,
- Espectroscopía Raman Dr. Roberto Sato de CCADET UNAM,
- Espectroscopía FT-IR Dr. Ocotlán Flores de CCADET UNAM,

Al apoyo del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del CCADET, UNAM.

Por su apoyo técnico al Sr. Hugo A. Sánchez Flores del CCADET de la UNAM y por la asistencia técnica en el SEM a Jaqueline Cañetas y Mario Monroy de Instituto de Física de la UNAM.

*Dedicado a mi hijo y mi esposo
por ser fuente de inspiración y pilar de mi vida.*

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	10
Tejido óseo	10
Proceso de regeneración ósea	12
Biomateriales usados como sustitutos óseos	14
Prueba de bioactividad, inmersión en SBF y formación de la capa de apatita	22
ANTECEDENTES	26
METODOLOGÍA	31
Planteamiento del problema	31
Justificación	32
Hipótesis	33
Objetivo General	33
Objetivos específicos	33
Tipo de estudio	34
Variables	34
Criterios	34
Inclusión	34
Exclusión	34
Eliminación	34
MATERIALES	35
Reactivos	35
Otros:	35
Material	35
Equipo	36
MÉTODOS	37
Técnicas de caracterización	37

Fluorescencia de rayos X (FRX)	37
Difracción de rayos X (DRX)	37
Espectroscopía Raman	37
Microscopía electrónica	38
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	38
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	38
Área superficial y porosidad	38
Microscopía óptica	39
Porosidad total	39
Materia prima	40
Ajuste de las proporciones del biovidrio	42
Obtención de los biovidrios experimentales	43
Prueba de Bioactividad “<i>in vitro</i>”, Inmersión de los biomateriales en disolución fisiológica simulada	48
Preparación de la disolución	48
Prueba de inmersión a 4 semanas	50
Identificación de la capa de apatita	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
Análisis del material control PerioGlas® Novabone	52
Caracterización de los biovidrios experimentales antes de la prueba de inmersión en SBF	54
Análisis por Fluorescencia de Rayos X	54
Análisis por Difracción de Rayos X	56
Caracterización de los biovidrios después de la inmersión en SBF	58
Análisis por Espectroscopía Raman	58
Análisis por Microscopía Electrónica	62
Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)	62
Microscopía electrónica de barrido SEM, mapeo y análisis elemental por EDS.	64
Formación de andamios 3D	77
Área superficial y porosidad	77
Porosidad por Microscopía óptica	77
Porosidad por Microscopía electrónica (SEM)	79
Porosidad total por Principio de Arquímedes	80
Análisis de los resultados	81
CONCLUSIONES	83
PERSPECTIVAS	84
ANEXOS	85
Índice de tablas	85

Índice de gráficas	86
Índice de figuras.	87
Índice de abreviaturas	89
REFERENCIAS	90

Resumen

En el presente trabajo se estudia la posibilidad de usar la cáscara de arroz como fuente de silicio en la síntesis de un material bioactivo; utilizando el método sol-gel, como alternativa a la técnica tradicional por rampas de calentamiento. Partiendo de un proceso de depolimerización de la sílice, proveniente de la ceniza de cáscara de arroz y glicerol se llega a un sólido poroso de sílice amorfa y calcita. La formación de una capa de apatita, después de la inmersión en una disolución fisiológica artificial, fue la pauta para evaluar la funcionalidad del material sintetizado.

Abstract

In the present paper the possibility to obtain a useful material as silicon source from "the ash rice husk in the synthesis of a bioactive glass" is studied, using the sol-gel method like alternative to traditional technique of heating ramps. Starting from the depolymerization silicas process from ash rice husk and glycerol which get convert in a porous solid amorphous silica and calcite. The test to asses the functionality of this synthetized material was the positive apatite lay formed after the immersion in an artificial physiological disolution.

Introducción

Con el propósito de reparar los tejidos óseos que por diversas causas se pierden o se dañan, en el área médica y odontológica, se han buscado biomateriales que logren favorecer la reparación ósea que se da de manera natural o que reemplacen la zona dañada. Así, a lo largo del tiempo se han implementado prótesis, trasplantes o implantes que invariablemente en todos los casos deben presentar biocompatibilidad, funcionalidad y accesibilidad.

Para el caso específico de los biomateriales usados para sustituir los tejidos duros del cuerpo (sustituto óseo) se han propuesto tanto materiales metálicos (implantes de titanio) como el uso de vitrocerámicas y biovidrios.

Los sustitutos óseos son materiales muy apreciados debido a que la gama de aplicaciones reportadas en medicina y odontología son muy diversas; en ortopedia, implantes dentales, reconstrucción maxilofacial, otorrinolaringología, recubrimiento de materiales, reconstrucción de bolsas periodontales y reborde alveolar.^{1, 2} De aquí que continuamente se buscan nuevas tecnologías para mejorarlos y hacerlos más accesibles. Sin embargo, estos materiales deben cumplir con propiedades muy especiales que han sido descritas por diversas asociaciones,³ entre ellas la bioactividad.

Desde 1991 Hench demostró que “La formación de una capa de apatita (HAp) sobre la superficie de los biovidrios es un requerimiento esencial para que el material se enlace directamente al hueso”.⁴ La exposición de este tipo de materiales a fluidos corporales (sangre, suero) o disoluciones fisiológicas artificiales (SBF) promueven la formación de ácido silícico; la precipitación de fosfatos de calcio y la formación de la capa de apatita que favorece la unión al hueso. A los materiales que forman esta capa se les conoce como materiales bioactivos.

Se ha demostrado que diversas composiciones de los biovidrios, cerámicas, vitrocerámicas y composites tienen la capacidad de desarrollar uniones mecánicamente fuertes con el hueso. Sin embargo también se han reportado que cambios en su composición definen el tipo de material como bioactivo, bioinerte o reabsorbible.

Debido a que la bioactividad y la capacidad de regeneración ósea dependen de la velocidad de disolución y de la formación de la capa de apatita; el método de síntesis resulta importante, lo cual se debe a que dichas propiedades dependen tanto de la composición como de la estructura.⁵

El método tradicional de síntesis de los biovidrios es por medio de la sinterización por rampas de calentamiento^{6,7} el cual emplea grandes cantidades de energía; pues requiere temperaturas de más de 1500 °C por un promedio de 12 horas. Por otro lado, la cristalización que se da durante el sinterizado constituye una desventaja para el material ya que no permite la fabricación de andamios ni recubrimientos en materiales usados para fabricar implantes. Otro método que se ha probado en la producción de los biovidrios es el sol-gel; el cual se ha visto que mejora la eficiencia de la producción y añade ventajas inherentes a la técnica como la nanoporosidad.^{8,9,10}

En general, el alto costo de los biovidrios aunado a las dificultades para conseguirlos en el país hace que su uso, en ocasiones, no sea factible. Por lo cual la búsqueda de materiales alternos, económicos e igualmente eficaces es un reto actual. Con el desarrollo de este proyecto se pretende contribuir con los esfuerzos para conseguir el equilibrio entre la función y el acceso a dichos materiales.

La materia prima seleccionada para la síntesis de todos los materiales constituye un factor importante que influye en el costo del producto final. De aquí que la importancia del uso de desechos industriales como materia prima, en la síntesis de materiales, ha cobrado importancia en los últimos años. La cáscara o pajilla de arroz constituye el 20% de la planta, ésta se retira y aunque teóricamente tiene algunas aplicaciones ha resultado muy difícil llevarlas a la práctica. En México se produce en aproximadamente 44 mil toneladas anuales (SAGARPA 2008). La aplicación en el área biomédica de materiales como éste es un tema que ocupa a muchos investigadores. Las cenizas de cáscara de arroz provenientes de la arrocería Covadonga presentan un contenido aproximado de 95% de SiO₂ y trazas de materiales inorgánicos; componentes incluidos en la síntesis de materiales bioactivos. Para el caso de los vidrios bioactivos se ha investigado la aplicación de productos derivados de las cenizas de la cáscara de arroz en la síntesis por la técnica sol-gel, con resultados alentadores.¹¹

En el laboratorio de Materiales y Nanotecnología del Centro de Ciencias Aplicadas de la UNAM se han realizado diferentes estudios acerca del proceso de depolimerización de la sílice proveniente de cenizas de cáscara de arroz en contacto con glicerol y su beneficio en el proceso sol-gel para la obtención de materiales porosos.¹² Es por ello que se plantea adaptar este protocolo en la síntesis sol-gel de materiales bioactivos.

La síntesis a realizar se propone para la obtención de un material bioactivo con una composición dentro del sistema SiO_2 (38-65%), Na_2O (15-30%), CaO (10-24%) y P_2O_5 (0-8%). Por lo tanto, partiendo de la cáscarilla de arroz rica en SiO_2 se esperaría abatir el costo del posible material bioactivo obtenido.

Para el desarrollo del trabajo planteado se llevó a cabo la síntesis de materiales en diferentes condiciones experimentales y se estudió la evolución de la formación de la capa de apatita en cada muestra. Llevándose a cabo una caracterización completa por fluorescencia de rayos X (FRX), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía Raman, microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución (HRTEM)/difracción de electrones, microscopía electrónica de barrido (SEM)/mapeo/EDS, isoterma de adsorción/desorción de N_2 (área superficial, porosidad total y tamaño de poro), microscopía óptica, y porosidad total.

Los resultados muestran que con el método de síntesis establecido es posible conseguir un material con una composición similar a la del bioglass 45S5, con andamios macroporosos y una superficie adecuada para favorecer la formación de apatita en la superficie, después de la inmersión en una disolución fisiológica simulada.

Marco teórico

Tejido óseo

En el cuerpo humano los únicos tejidos duros son los dientes y huesos. El esqueleto maduro consta de 206 huesos. Estos son el soporte mecánico y anclaje de músculos y tendones. El movimiento corporal se permite por este complejo de palancas. Además tiene funciones biológicas importantes. Es la reserva de P y Ca más grande en el organismo y por ello es regulador de la concentración iónica en la sangre, con lo que se logra el equilibrio metabólico y hormonal. También dentro de ellos, en la medula ósea, se generan las células de la fórmula roja y blanca.¹³

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado duro y elástico; capaz de proporcionar soporte, además de proteger a los tejidos blandos. Constituye una fuente de células troncales hematopoyéticas y mantiene la homeostasis mineral. Está involucrado en un ciclo constante de formación y resorción ósea, es decir está en constante remodelación. Dicho proceso se controla por la regulación hormonal y los requerimientos mecánicos.¹⁴

El hueso se forma principalmente de matriz extracelular y cuatro grupos de células; osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células osteogénicas. La matriz extracelular está compuesta de una fase mineral, colágena y proteínas no colágenas; la osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina y factores de crecimiento. Los osteoblastos, son las células que realizan proceso de formación de fosfato cálcico amorfo, que funciona como núcleo y reservorio para el crecimiento de Hidroxiapatita. La fase inorgánica del hueso esta constituida principalmente por hidroxiapatita deficiente en calcio, fosfato y grupos hidroxilo.^{14,}

¹⁵

La relación Ca:P en este tejido se encuentra reportada entre 1.4:1.5 y 1.6:1.7, el tamaño diametral de los cristales es de 5-100 nm. En la estructura del cristal de apatita es posible observar sustituciones iónicas de elementos traza como magnesio, estroncio, flúor y carbono. Diferencias que dan como resultado una

apatita suficientemente insoluble para ser estable, pero convenientemente reactiva para permitir la resorción y la formación constantes.¹⁴

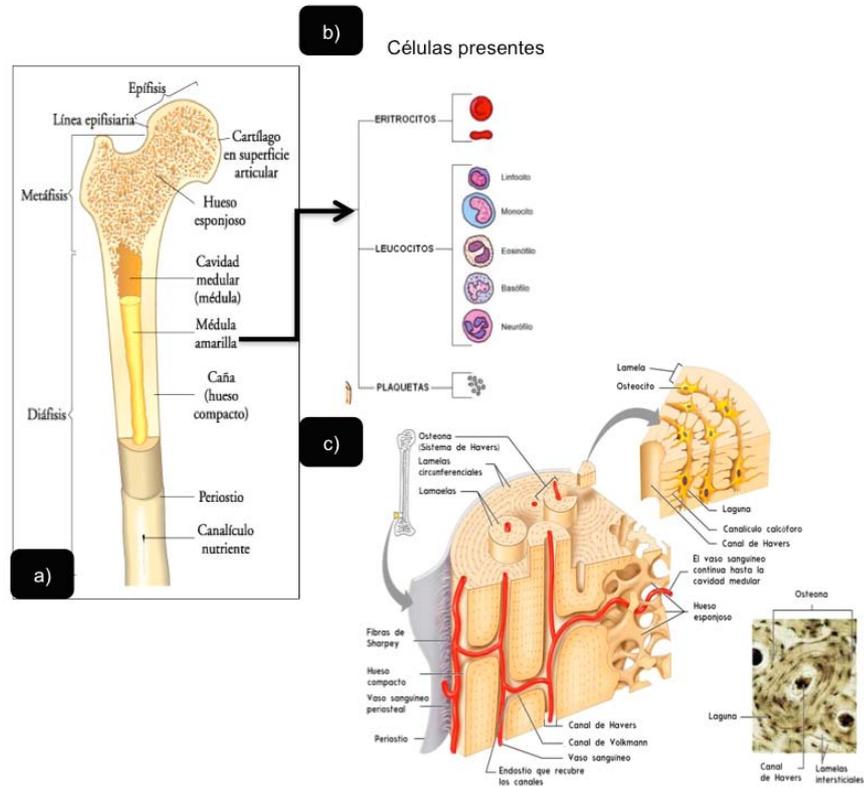
En su estructura macroscópica, 20% del volumen total del tejido óseo corresponde al hueso esponjoso o trabecular y continuo; el otro 80% corresponde al tejido óseo cortical o compacto.

El hueso cortical es la capa más externa de los huesos; sólo tiene el 10 % de porosidad y su espesor aumenta en zonas de alta carga mecánica. La unidad básica del tejido óseo cortical es una estructura cilíndrica llamada osteona o sistema Haversiano. Estos a su vez se forman por una matriz ósea mineralizada que se dispone en laminillas individuales. Estas laminillas se estructuran concéntricamente alrededor de los canales de Havers; que son canales vasculares longitudinales que contienen capilares, vénulas postcapilares y arteriolas. Las laminillas o lamelas se encuentran alrededor de lagunas que contienen a los osteocitos. De cada laguna irradian canalículos ramificados que permiten la comunicación y la nutrición de los osteocitos.^{13,14,}

El hueso trabecular consiste en una red interconectada de tejido óseo llamada trabécula. La red está orientada en el sentido de los esfuerzos sin embargo, es un tejido menos resistente que el hueso cortical debido a que su porosidad oscila entre 50 y 90%.

El hueso esponjoso tiene la capacidad de resistir fuerzas de compresión y tensión según el grado de porosidad y la arquitectura de las trabéculas. Debido a que gran parte del tejido óseo es mineralizado los poros del hueso trabecular son importantes, ya que ahí se alojan vasos sanguíneos y medula ósea; de dónde recibe la nutrición necesaria todo el tejido.¹⁴ El hueso es un material viscoelástico en el que la resistencia y módulo elástico varían en cada hueso; esto depende de la composición, densidad, disposición y requerimientos mecánicos. El módulo elástico de los cristales de hidroxiapatita es de 114 GPa y el del colágeno 1.41 GPa. El hueso es un material anisotrópico, es decir que sus propiedades dependen de la dirección en que se le estudie.^{13,15}

Fig 1. Representación gráfica del Sistema óseo.



a) Representación de un hueso largo y sus partes, b) Células presentes en la médula c) Organización del sistema.

Proceso de regeneración ósea

Éste proceso es posible mediante un complicado conjunto de eventos celulares y moleculares. Puede explicarse por tres procesos separados entre sí que se superponen a lo largo del proceso de regeneración ósea. El conjunto y la interacción de la osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción; es lo que permite el éxito de la regeneración ósea.

- Osteogénesis; es la formación de nuevo hueso a partir de células osteogénicas.
- Osteoinducción; es la estimulación de la osteogénesis mediante diferentes factores capaces de reclutar células osteogénicas y diferenciarlas hacia fenotipos osteogénicos.
- Osteoconducción; es el desarrollo de una matriz o una malla tridimensional que sirve de soporte para la formación de hueso nuevo.

Cualquier material que se emplee para en la reparación de lesiones óseas debe poseer al menos uno de estos procesos.^{18,19}

Biomateriales usados como sustitutos óseos

La Asociación Europea de Biomateriales define un biomaterial como el material no vital que se utiliza en aplicaciones médicas con el fin de obtener una interacción con un determinado sistema biológico. Su origen puede ser natural, sintético o una combinación de ambos e implantarse en el organismo para tratar de restituir la función, sustituir o aumentar un tejido u órgano.³

Existe una amplia variedad de biomateriales: este trabajo centra la atención en aquellos utilizados para la sustitución de los tejidos duros, también llamados sustitutos óseos. (Fig. 2) Todos ellos deben cumplir con características muy especiales que han sido descritas a lo largo de la historia y de acuerdo al tiempo.

Fig 2. Representación gráfica de los usos de los materiales de sustitución ósea.



Al describir las características que deben presentar los biomateriales, específicamente los utilizados como sustitutos óseos, la biocompatibilidad encabeza la lista. Siendo esta la capacidad de un material para ser utilizado en una aplicación específica, con una respuesta adecuada del tejido con que tiene contacto. Esta capacidad está caracterizada por la ausencia de una respuesta

inflamatoria ya sea aguda o crónica, durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos.¹⁴

Otras características importantes son la baja citotoxicidad, la osteogénesis, bioabsorción y que funcionen como soporte estructural con propiedades mecánicas similares a las del tejido dónde se implante. Además, la interfase entre el material y el tejido conectivo circundante debe ser estable y presentar reacción fibrosa mínima. También puede mencionarse la capacidad de vehiculizar sustancias. Y desde el punto de vista clínico, que sean fáciles de usar y con una relación costo-beneficio razonable, es decir, que exista equilibrio entre la función y el acceso a dichos materiales.¹⁴

Los biomateriales que son usados como sustitutos óseos son de gran importancia para el área médica, por la gran demanda en los procedimientos clínicos que involucran su uso como en ortopedia, oftalmología, otorrinolaringología o reconstrucción maxilofacial. También se han reportado aplicaciones muy diversas en odontología, tales como implantes dentales, lesiones periodontales, elevación de la cresta ósea, conservación ósea en los sitios en que se realizan extracciones, relleno de lesiones óseas tipo quistes, granulomas dentales, cáncer, lesiones traumáticas, etc.¹

Existen diversos tipos de biomateriales que pueden tener como fin la sustitución ósea. Se pueden clasificar como autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y los sustitutos óseos sintéticos. De acuerdo a sus propiedades, la primera elección son los implantes de elementos naturales, ya sea de hueso del propio paciente o del obtenido de otras especies (autoinjertos, aloinjertos).²⁰ Si bien son una buena alternativa, es una realidad que estos presentan limitaciones muy definidas; pueden presentar mayores riesgos de rechazo, complicaciones clínicas postoperatorias y la cantidad de la que se dispone es limitada, así como la forma del material obtenido. De aquí ha surgido el desarrollo de sustitutos óseos sintéticos, nuevos materiales obtenidos de forma artificial que reducen dichos riesgos y proporcionan una solución a los problemas presentes.

La **primera generación** de biomateriales utilizados como sustitutos óseos fueron los **bioinertes**; estos minimizan la formación de tejido de cicatrización en la interfase con los tejidos. Sólo tenían como objetivo ser un material tolerable por el cuerpo y con propiedades mecánicas suficientes para soportar las sobrecargas fisiológicas sin embargo, son eficientes solo a corto plazo. La **segunda generación** pertenece a los biomateriales que presentan otra propiedad llamada **bioactividad**; esta es la capacidad de un material de interactuar químicamente con los tejidos blandos y duros del organismo e inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida.²¹ Entonces, un material bioactivo es aquel que posibilita una respuesta biológica específica en relación con los tejidos favoreciendo su enlace. Los primeros fueron los vidrios bioactivos se descubrieron en 1969 como la primera alternativa de segunda generación: en ellos existe unión en la interfase del implante con los tejidos. Cuando estos biomateriales bioactivos presentan la propiedad de regenerar y la reparar los tejidos con activación de genes, constituyen la **tercera generación** de biomateriales.²²

De acuerdo a las generaciones descritas, han sido investigados y probados muchos materiales tanto metálicos como cerámicos y poliméricos o combinaciones de estos. Los materiales sintéticos de **tipo cerámico** se dividen en cuatro tipos:

1. Los basados de *sistemas de silicio* que son los vidrios bioactivos y los ionómeros vítreos.
2. Los *fosfatos cálcicos*: a los que corresponden los β Trifosfato cálcico, la hidroxiapatita coralina o sintética y cementos óseos de fosfato de calcio.
3. Los *óxidos de aluminio*
4. Los *sulfatos cálcicos*.

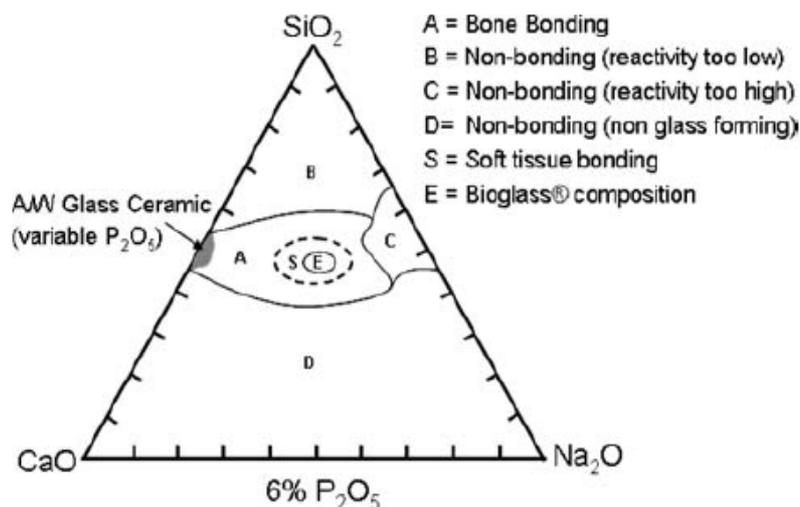
De estos los más destacados son las biocerámicas de fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico- β , los cementos óseos de fosfatos de calcio y los vidrios bioactivos derivados de sistemas de $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$. Todos ellos tienen en común su biocompatibilidad, sin embargo, las características como bioactividad y osteoconductividad, varían de acuerdo al material y limitan su uso

en muchos casos.^{14,23}

Muchos investigadores en el área biomédica, ingeniería de tejidos y biomateriales han puesto especial atención en los vidrios bioactivos ya que además de cumplir con la bioactividad^{24,25,26,27} y otras propiedades consideradas ideales para los sustitutos óseos, también han demostrado influir en la osteogénesis.²⁸ Los vidrios que son considerados bioactivos en su composición presentan menos del 60% mol de SiO_2 , un alto contenido de Na_2O y CaO y una proporción CaO/P_2O_5 mayor de 5:1. Entre estos materiales se encuentran los del tipo Bioglass®, los cuales son derivados de sistemas $Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5$. Y pertenecen a la tercera generación de biomateriales bioactivos ya que ha demostrado influir en la osteogénesis.²⁸

La primera composición del Bioglass®, el 45S5, fue desarrollada por Larry Hench; sus primeros trabajos fueron publicados en 1971. Este material ha estado en uso clínico desde 1985 y su formulación se constituye de SiO_2 (45%), Na_2O (24.5%), CaO (24.4%), P_2O_5 (6.1%), eutéctico ternario que se basa en el siguiente diagrama:

Fig 3. Diagrama ternario del Bioglass.



Se muestra en el centro (E) la composición original del Bioglass® 45S5. En el área S marcada con la línea punteada se observa una unión fuerte con los tejidos, mientras que en el área A se da una unión suave. Los tres componentes, en el área B o C no se da la unión con los tejidos, mientras que en el área D no se forma el vidrio.

Diferentes estudios han surgido con el fin de describir el mecanismo por el cual se da la unión entre el vidrio bioactivo y los tejidos, siendo de los primeros trabajos el descrito por el Dr. Greenlee⁶ quien reporta en general lo siguiente:

- Los biovidrios se enlazan químicamente al hueso mediante una capa de apatita de características similares a las de la apatita ósea, esta se forma en la superficie de los materiales en contacto con disoluciones fisiológicas simuladas.²⁹
 - La exposición de este tipo de materiales a fluidos corporales o disoluciones fisiológicas promueven la formación de ácido silícico, la precipitación de fosfatos de calcio y la formación de la capa de apatita que favorece la unión.²⁴
 - “La formación de la capa de apatita sobre la superficie del biovidrio es un requerimiento esencial para que el material se enlace directamente al hueso”.⁴
- Adicionalmente, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de estos materiales por la liberación de fosfatos.³⁰

Por otra parte, Shirliff y Hench, explican la reacción de formación de apatita en cinco pasos.

- 1º Liberación de iones Na^+ , K^+ , H^+ H_3O^+
- 2º Pérdida de sílice soluble $\text{Si}(\text{OH})_4$
- 3º Condensación y repolimerización de SiO_2 en la capa superficial
- 4º Migración de Ca^{2+} y PO_4^{3-}
- 5º Cristalización de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ en la incorporación a la capa del OH^- y CO_3^{2-}

Diferentes formulaciones de materiales bioactivos^{31,32} han surgido, evidenciando la formación de la capa de apatita. Además, se han mostrado los efectos por la modificación del porcentaje en los componentes y por la adición de algunos otros compuestos. Respecto al contenido de SiO_2 , 45 es el porcentaje usado como referencia, ya que fue el primero en probarse. Un contenido mayor o igual a 60% ya no favorece la unión y se convierte en un material bioinerte⁴. Sin embargo, existen estudios que proponen que aunque no exista una unión propiamente sí se presenta un efecto en la respuesta de las células que favorece la osteogénesis.^{1,28} Silver en 2001 propuso que mayores concentraciones de SiO_2 (hasta 80%) no alteran el pH favoreciendo la osteogénesis y el tiempo de vida de las células.

A lo largo de la historia de estos materiales con la finalidad de mejorarlos se han dado a conocer varias modificaciones. Kasuga³³ obtuvo vidrios de fosfato inversos, la adición de Al_2O_3 hasta en 1.5 % en peso disminuye la solubilidad del vidrio sin afectar la mineralización o unión del tejido óseo.

Otros autores han trabajado en la sustitución de los cationes Na y Ca en el sistema $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, por Al, Fe, Ti, Mg, K, etc. Para aplicaciones biomédicas^{1,34}. Wei en 2008¹⁰ reporta el efecto de la incorporación de micropartículas y nanopartículas de TiO_2 en la biocompatibilidad y bioactividad. Saboori 2009⁹ menciona los beneficios de la inclusión de MgO en relación a la mejora de las propiedades mecánicas y su biocompatibilidad. Se ha probado la sustitución del Na_2O por Li_2O ³⁵ y se ha buscado reforzar el material con nanotubos de carbón.

El método tradicional utilizado para la preparación de vidrios bioactivos ha sido por rampas de calentamiento; Rivera en el 2011³⁶ reporta la síntesis de un vidrio bioactivo por este método. Sin embargo, en los últimos años se ha sustituido el método tradicional de sinterizado por el método sol-gel,^{37, 38} mismo que proporciona mejores condiciones de mezcla y tiene la ventaja de requerir menos recursos energéticos. Además, en la actualidad no solo se han reportado cambios y sus beneficios sino también con el uso de nuevas técnicas de caracterización ha podido estudiarse a detalle la función que tiene cada uno de los componentes.³⁹

Por otra parte estudios de vanguardia enfatizan el uso de desechos agroindustriales para la creación de materiales de uso biomédico. En 2009 se reportó el uso de caña de azúcar y Bioglass® 45S5 en la construcción de andamios biomorficos.⁴⁰ Nayak en 2010¹¹ reportó el uso de la ceniza de cáscara de arroz como fuente de SiO_2 en la obtención del silicato de sodio, materia prima utilizada en la síntesis de un vidrio bioactivo por medio del método sol-gel, reportando buenos resultados en la formación de la capa de apatita en la superficie después de la inmersión en suero fisiológico simulado.

Ciro en 2015⁴¹ prueba la combinación de un cemento de fosfato y biovidrio para aplicación como cemento de relleno óseo, obteniendo propiedades favorables en la bioactividad y porosidad de 62%.

Sin embargo, al seguirse usando aleaciones metálicas como tratamiento en ortopedia se intenta también usar los biovidrios como recubrimiento para mejorar la interfase con este tipo de implantes, el estudio de Correa 2010⁴² muestra la posibilidad de recubrir una aleación 316L con un biovidrio del sistema $\text{SiO}_2 - \text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ preparado por sinterizado, con la técnica deposición por llama para adherirlo al metal. Y Sheng en 2015⁴³ estudió aleaciones de magnesio recubiertas por biovidrio para aplicaciones ortopédicas en las que se mejora la resistencia a la corrosión y fuerza de adhesión y cohesión.

Aunque la combinación con otros materiales es una buena alternativa la mayor parte de la investigación se concentra en hacer de los biovidrios por si mismos un material ideal con modificaciones en la composición, la síntesis y las temperaturas en ella usadas.

Se han estudiado mucho los vidrios bioactivos silico-fosfatos derivados de sistemas de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ dopados con iones como Sr, Cu, Mg, Zn, Co, B, Ag, Ga, Fe, K e incluso combinaciones con HAp y otros fosfatos, en general se han descrito sus efectos benéficos en el metabolismo óseo y su regulación. Muchos vidrios bioactivos han demostrado ser osteogénicos y bioactivos, también mostraron inducir y promover la mineralización y diferenciación celular; las composiciones son tan variadas como su campo de aplicación. Se han descrito efectos de la inclusión de elementos (como Ag, Sr, F, Mg, P, Zn, Al) en la red cristalina, en la bioactividad, en la morfología y la importancia de estos cambios para la ingeniería de tejidos.⁴⁴

Otro de los materiales más usados para mejorar las propiedades es la inclusión de Zr en 2015, Montazerian; lo incluye en un biovidrio con tratamiento térmico a 1000° aprox. Con buenos resultados en la prueba de inmersión y dureza, por otro lado se menciona la inclusión de varios porcentajes de K_2O en el que varían del 2

al 6% mol. Observando un mejor comportamiento térmico y mecánico conforme disminuye su contenido.⁴⁵

Otras incursiones más recientes orientan la incorporación de los biovidrios a materiales como el quitosan tal es el caso del estudio de Pourhaghgouy 2016; en el que se confirma la bioactividad del material después de la incorporación de un biovidrio con 64% SiO₂ en andamios de nano compuestos de quitosan.⁴⁶ Kovtun 2015 realizó un estudio in vivo de una nueva gelatina proveniente del frijol de soya en espumas de HAp que mejora la biocompatibilidad.⁴⁷

Prueba de bioactividad, inmersión en SBF y formación de la capa de apatita

El avance de la investigación, en la búsqueda de nuevos biomateriales de sustitución ósea que se aproximen a lo ideal, requiere de pruebas que de forma más rápida, económica, y eficaz logren definir la funcionalidad del material.

Para este tipo de biomateriales la funcionalidad se evidencia por su bioactividad. Como alternativa inicial a las pruebas *in vivo* para materiales experimentales en este campo surgen las pruebas *in vitro*, tal como la inmersión en SBF. Estas pruebas han permitido comprobar, de una manera más sencilla y eficiente, si un material es bioactivo por medio de la formación de una capa de apatita en la superficie del material. Disminuyendo así tanto la cantidad como el tiempo utilizado en la realización de las pruebas biológicas sobre todo en materiales experimentales para los que se hacen gran cantidad de modificaciones.

A lo largo de la historia, los biomateriales usados en las diferentes áreas de la salud para regenerar tejidos duros han sido diversos. Se han utilizado desde materiales metálicos como el titanio, materiales cerámicos, polímeros o una combinación de estos. Todos ellos han tenido una evolución significativa encaminada a la regeneración óptima del tejido pero también atravesado por un arduo camino que involucra numerosas modificaciones a las composiciones y métodos de prueba; ninguno de estos esfuerzos valdría la pena si no se puede probar la funcionalidad del material creado. Pero realizar pruebas biológicas para cada nuevo material tendría un costo que posiblemente excedería a las posibilidades de muchos investigadores de aquí la importancia de las pruebas *in vitro*.

Como se ha mencionado anteriormente, el aspecto más importante a considerar en los biomateriales es la biocompatibilidad y la bioactividad.

Uno de los problemas más graves con respecto a la biocompatibilidad en los materiales implantados es la reacción de la interfase. Materiales como las

vitrocerámicas o biovidrios resuelven dicho problema; sus cadenas silico-fosfatadas se enlazan en la superficie por intercambio iónico en contacto con un medio fisiológico, haciendo posible la osteointegración, por medio de la formación de una capa de apatita hidroxycarbonatada.

Como se ha mencionado, la necesidad de encontrar materiales que reduzcan el riesgo de rechazo o transmisión de patógenos ha impulsado la investigación en la síntesis de materiales sintéticos con capacidad de desencadenar bioactividad.

Las pruebas usadas para respaldar el funcionamiento de este tipo de materiales pueden ser *in vivo* e *in vitro*. Dentro de las primeras, también llamadas pruebas biológicas, se encuentran aquellas en las que se usan líneas celulares y las que utilizan animales de laboratorio, ambas implican elevados costos tanto materiales como el sacrificio de un gran número de sistemas biológicos. De aquí el interés de desarrollar pruebas que disminuyan dichos costos, como son las pruebas *in vitro*.

Las pruebas *in vitro* preceden a las *in vivo* y tienen la finalidad de disminuir el número de éstas últimas. Realizando pruebas *in vivo* únicamente con aquellos materiales que manifiestan bioactividad *in vitro*.

Una de las pruebas de bioactividad más usadas es la inmersión en una disolución artificial que se conoce como “prueba *in vitro* de inmersión en SBF”. La prueba consiste en sustituir el medio fisiológico por una disolución artificial que contiene los mismos iones que el medio natural y como resultado se obtiene la precipitación de una capa superficial de apatita, que es un material muy parecido al biológico.

En 1991 Hench y cols.^{4,48} establecieron que los materiales bioactivos son aquellos que en presencia de disoluciones artificiales que tengan concentraciones iónicas similares a las del plasma de la sangre forman una capa de apatita en la superficie, validándose este método en 2006⁴⁹: la importancia de esta prueba se ha ido incrementando con la aparición de nuevos sustitutos óseos y su creciente demanda.

La disolución usada en esta prueba es de apatita y calcita sobresaturada. Takadama et al.⁵⁰ propusieron una corrección al protocolo original de Kokubo, con respecto a la concentración de los iones cloruro (Cl⁻), mejorando su estabilidad y reproducibilidad.

Diversos estudios con materiales como titanatos y biovidrios del sistema SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ demuestran la formación de la capa de apatita en contacto con SBF, al igual que las pruebas *in vivo*, con una firme unión al hueso. Por ello se infiere la funcionalidad de la prueba para predecir la bioactividad.⁷

Por otro lado, son varios los materiales (hidroxiapatita sinterizada, b-fosfato tricálcico, cerámica bifásica y cerámica de apatita cristalina y wollastonita⁷) que han demostrado tener un mecanismo de unión al hueso cuando interactúan con la disolución, resultando ser una prueba muy versátil.

La aplicación de la prueba de inmersión en SBF ha generado gran controversia por la dificultad para realizar la disolución. De aquí que diferentes investigadores^{27,51,52} han revisado tanto la metodología como los reactivos que se utilizan. A pesar de la dificultad en la preparación de dicha disolución, sigue siendo la alternativa más viable antes de las pruebas *in vivo*.

Cada vez son más los autores que utilizan esta prueba como determinante para avalar el funcionamiento de los materiales; Bohner y Lemaitre⁵⁰ realizaron una revisión de la misma. Ellos establecen que es necesario un estricto control de las condiciones experimentales y que el protocolo de Kokubo y Takadama²⁷ podría simplificarse y mejorarse para obtener resultados reproducibles.

De aquí podemos concluir que la prueba de inmersión en SBF nos da un buen indicio de bioactividad sin embargo, el método de preparación de la solución SBF es determinante.

Por otra parte, saber de la existencia de la formación de apatita tiene cada vez más ventajas. Jones et. al.⁸ muestran nueva evidencia con respecto a la

osteogénesis inducida por la formación de la capa de apatita. Si bien esta prueba no sustituye las pruebas *in vivo* si proporciona sustento para acortar el tiempo y recursos de las mismas.⁵³

Para la preparación de la disolución fisiológica (SBF) en la que se realizó la inmersión de las muestras y observar la formación de la capa de apatita fueron considerados varios procedimientos reportados: la patente 2242851- 2001-2005, el protocolo de Cüneyt 2000, la norma ISO/ FDIS 23317:2007(E), el protocolo de Kokubo modificado en 2006 y algunos artículos que han usado esta prueba para verificar la presencia de la capa de apatita.^{54, 55, 56, 57} En ellos se encuentran variaciones en los métodos de prueba, los componentes y las condiciones de preparación de la disolución, pero se demuestra la vigencia de éste método para probar la bioactividad de los materiales. Por lo que se tomó como prueba determinante para verificar la funcionalidad de los materiales generados en este trabajo.

Antecedentes

Desde hace algunos años el interés por dar uso a la cascarilla de arroz ha impulsado a muchos investigadores a buscar aplicaciones en áreas muy diversas. El área biomédica e ingeniería de tejidos no es la excepción.

Algunos autores se han interesado en las cenizas de este material (RHA) por su gran contenido en sílice. Existe información de su uso como fuente de silicio y su aplicación como precursor de materiales como cerámicas o biovidrios por el método tradicional de sinterizado.

En 2013 Yücel⁵⁸ reporta la fabricación de biovidrios por el método tradicional de sinterizado con RHA como fuente de silicio, comparado con una sílice comercial. Reportando resultados en la prueba de inmersión, microscopía y DRX que indican el uso posible de la RHA en los biovidrios. Mientras que en el departamento de física y ciencia de materiales de la Universidad de ChiangMai se compara la cristalización de biovidrio Bioglass®45S5; a partir de sílice comercial y de RHA, formándose en ambos casos la fase $\text{Na}_2\text{-Ca}_2\text{-Si}_3\text{-O}_9$.⁵⁹

Por otra parte, Ahumada en 2006 muestra que es posible utilizar la RHA en la síntesis de silicatos de calcio, utilizada como fuente de silicio en la síntesis de biovidrios.⁶⁰ Además, la RHA ya ha sido utilizada como agente espumante en la fabricación de andamios de Bioglass® encontrando que favorece la porosidad y resistencia, sin afectar la bioactividad del material.⁶¹ Sin embargo, el uso de la RHA como fuente directa de silicio no ha sido reportado.

En relación a los elementos menores y traza que no forman parte de la formulación del biovidrio pero que se encuentran en la ceniza de cáscara de arroz, puede encontrarse en la literatura diversos estudios respecto a su uso en los biomateriales.

Uno de los elementos traza es el *titanio*, del cual ya son muy conocidas sus propiedades de biocompatibilidad y bioactividad. Uno de los beneficios que han sido reportados sobre la inclusión del titanio en los biovidrios, es en relación a la formación de la capa de apatita: aumenta la resistencia de la unión, específicamente la fase anatasa, favorece la nucleación.^{10,62} Otro es en el caso de los recubrimientos donde mejora la continuidad de la interfaz entre uno y otro material.⁶³ En relación a las propiedades mecánicas, aumenta la dureza y disminuye el modulo de Young, mejorando la resistencia a la corrosión.^{31,34,64}

Otro de los elementos que es bien sabida su biocompatibilidad y bioactividad es la *alúmina*. Ésta en combinación con los biovidrios favorece la bioactividad pues la interacción con algunos elementos en el Biovidrio como el calcio y fosfato dan lugar a la formación fases como nepheline y fosfatos de aluminio.⁶⁵ También favorece la formación de la capa rica en sílice y con ello se favorece el desarrollo de cristales de hidroxiapatita carbonatada. Se ha reportado que en implantes se favorece la unión en las primeras fases, pues también se controla la solubilidad y estabilidad del implante mejorando la interacción con el hueso.⁶⁶ Por otro lado también se menciona la influencia de los tratamientos térmicos para modificar la densidad del material, lo que es importante para la degradación y duración del material.^{67,68}

Los compuestos de *magnesio* han sido muy estudiados, solos o en combinación con compuestos de titanio, estroncio, cinc o potasio. Se ha comprobado que mejora la bioactividad,^{38,69,70} promueve la deposición de la apatita generando saturación superficial y liberación iónica.⁷¹ Además proporciona mayor reactividad,⁷² influye en la ventana de sinterización, disminuyendo la Tg y Tc.^{73,74} Por otro lado incrementa el pH inicial generando un ambiente propicio para la cristalización de apatita.⁷¹ En pruebas celulares y animales se favorece la osteogénesis. Desde el punto de vista del propio material, un 2% mejora la cohesión interlaminar y la resistencia adhesiva entre capas y sustratos, lo que pudiera resultar en una mejora de las propiedades mecánicas.⁷⁵

Varanasi en 2009 reporta que el óxido de *potasio* en combinación con magnesio en el Biovidrio tiene efecto a nivel iónico con los marcadores osteogénicos;

importantes en el proceso de regeneración ósea. Por si solo el K_2O disminuye la rigidez del vidrio y el coeficiente de expansión térmica⁷⁶.

Bracci 2009 realizó estudios celulares y menciona la influencia de los iones de *magnesio*, estroncio y *manganeso* para aumentar la presencia de marcadores de diferenciación celular. Además activa la adhesión celular a nivel de integrinas⁷⁷.

El *hierro* se sabe que tiene injerencia en muchos procesos celulares, un ejemplo es la reacción de Fenton en la que actúa tanto Fe^{+3} como Fe^{+2} . Recientemente se ha reportado como elemento modificador de biomateriales. Algunas formas alotrópicas mejoran la resistencia del material y ha sido probado en ingeniería tisular por sus propiedades magnéticas.⁷⁸

En relación a la temperatura de calcinación del material Ravarian en 2010⁷⁹, reporta la síntesis de un biovidrio mezclado con HAp, sintetizado por sol-gel y calcinado a 1000°C. Mientras que Catauro en 2015 estudió la influencia del tratamiento térmico a 120, 600 y 1000°C en biovidrios del sistema SiO_2 -CaO- P_2O_5 , teniendo que la temperatura en que se tiene mejores propiedades es a 600°C.⁸⁰

Por otra parte, la obtención de estructuras 3D de materiales como fosfatos de calcio, HAp, fosfato tricálcico alfa y beta, con las técnicas de fabricación por sol-gel, replicación de espuma, electro-spinning o método de prototipo rápido se han vuelto motivo de estudio en el área de ingeniería de tejidos. Dichas estructuras de forma ideal no solo deben proporcionar un soporte estructural sino también estimular la proliferación y diferenciación celular. Esto no solo tiene que ver con la composición del material sino también con la porosidad, características de la superficie y rendimiento mecánico.⁸⁶

Day en 2004 muestra el efecto de los andamios en las propiedades del Bioglass 45S5 por medio de pruebas *in vitro* e *in vivo*, indicando que la presencia de los andamios favorece la neo vascularización y estimula el aumento de la secreción de factores de crecimiento. También indica que este proceso es independiente de

la adhesión y proliferación celular, ya que al elevar la concentración de Bioglass se inhibe la proliferación.⁸¹ Según la literatura los tamaños de poro que favorecen la actividad celular en este tipo de materiales tridimensionales se encuentran entre 100 y 500 μm . Mientras que los que favorecen la angiogénesis se encuentran alrededor de 50 μm .

Acorde a la literatura reportada, se puede identificar a un biomaterial como bioactivo si éste manifiesta la formación de una capa de apatita superficial después de someterlo, durante un tiempo, a una prueba de inmersión *in vitro* en solución fisiológica simulada (SBF). De aquí el interés de diversos investigadores en entender dicho proceso.

Liu et al. en 2004 en un estudio sobre bioactividad de wollastonita e HAp en SBF, describen el mecanismo de formación de apatita inicialmente como un intercambio de iones Ca^+ con los H^+ superficiales. Lo que conlleva a la formación de grupos silanol y al aumento de pH en la interfase, cargando la superficie negativamente con el grupo funcional (Si-O^-), posteriormente los iones Ca^{2+} en la disolución son atraídos, aumentando la actividad iónica a medida que se precipita apatita en la superficie.⁸² Mientras que Rey en 2007 analizó los nanocristales de HAp formados y concluye que estos contienen iones débilmente unidos, por lo que se favorece el intercambio iónico en medios biológicos y la formación de tejido óseo.⁸³

Hoppe en 2011 estudió los efectos de los productos de la disolución de los biovidrios y el rendimiento biológico de los andamios. Menciona que a pesar de los éxitos que se tienen en torno a los biovidrios y vitrocerámicas aún hace falta ahondar en la cinética de liberación para determinar concentraciones críticas y su efecto biológico. Se menciona el comportamiento favorable de los biovidrios hacia la angiogénesis y la estructura de andamio, pues la respuesta celular no solo depende de la composición sino también de sus propiedades de superficie y su topografía, estructura, rugosidad, porosidad, tamaño de grano e incluso cristalinidad.⁸⁴

Ravarian en 2010 estudió que la disolución de la red del biovidrio da la posibilidad de la deposición de apatita,⁷⁹ propone a los grupos silanol como catalizadores en la nucleación de la apatita. Mientras que Ayatollahia en 2015 reporta la función de la hidroxiapatita superficial y que al incorporar HAp en el biovidrio se mejora la biocompatibilidad, al existir unión química en la superficie por la simulación de un material parecido al biológico.⁸⁵

Numerosos investigadores han visto en los biovidrios un material con un futuro prominente. El intento por mejorarlos, combinarlos con otros materiales o como recubrimientos es cada vez más frecuente. Además ya se han probado fuera de aplicaciones en tejidos duros. Bairo en 2015 en su revisión y proyección de los biovidrios muestra su aplicación en la ingeniería de tejidos.⁸⁶

Metodología

Planteamiento del problema

El uso de materiales innovadores como los vidrios bioactivos cada vez es más importante debido a los beneficios que aporta. No obstante, no toda la población puede tener acceso a estos materiales ya sea por razones de economía o simplemente porque no se comercializan en el país. En general, se tiene acceso a las patentes de algunos de estos materiales lo que ha permitido su reproducción en México. La utilización de métodos diferentes a la sinterización se ha probado, como es el método sol-gel por hidrólisis. El uso de cáscara de arroz ha sido reportado como surfactante y como materia prima de los precursores con métodos complicados. Sin embargo, el método de obtención de un biovidrio a partir de ceniza de cáscara de arroz como fuente de silicio y por depolimerizado; aún no ha sido reportado.

Lo anterior ha generado la siguiente pregunta de investigación:

¿El biovidrio sintetizado, usando como material base la ceniza de cáscara de arroz por técnica sol-gel, favorecerá la formación de la capa de apatita en la prueba de bioactividad in vitro ?

Justificación

Siendo los materiales de sustitución ósea de gran importancia para el área médica. Este trabajo aporta a la investigación de nuevos materiales sintéticos, obtenidos por técnicas más eficientes y fuentes de materia prima de materiales poco usados la industria alimentaria.

La cáscara de arroz es producida a gran escala (110 000 Tons/año), al ser calcinada permite la eliminación de la parte orgánica de la planta y produce un material rico en sílice. Basados en estudios previos⁸⁷ sabemos que la cáscara de arroz de la empresa Covadonga de Ecatepec, Estado de México, México, presenta un contenido de **SiO₂ ≥95%** y trazas de elementos como el TiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, MnO, MgO, **CaO**, **Na₂O**, K₂O y **P₂O₅**

El desarrollo de biovidrios tipo Bioglass® a partir de la ceniza de cáscara de arroz por técnica sol-gel por medio de glicerol no ha sido reportado. La composición promedio de un biovidrio requiere de un mínimo de 45% de SiO₂ y en diferentes porcentajes CaO, Na₂O, y P₂O₅, todos presentes en las cenizas de cáscara de arroz junto con otros materiales; mismos que ya han sido reportados por varios autores para mejorar las características de los biovidrios y vitrocerámicas.

Por lo tanto, al utilizar las cenizas de la cáscara de arroz y materiales comerciales complementarios durante la síntesis del biovidrio, es de esperarse la formación del biovidrio y la subsiguiente formación de la capa de apatita; elemento determinante para la unión a los tejidos en que se implantarán. Por otra parte, utilizar las cenizas de cáscara de arroz, en el mayor porcentaje de la materia prima, para la obtención del biovidrio abate el costo del material obtenido.

Hipótesis

El biovidrio obtenido a partir del uso directo de las cenizas de cáscara de arroz, como fuente de SiO_2 en la síntesis por técnica sol-gel: es un soporte adecuado que permite la formación de la capa de apatita, en la prueba de bioactividad in vitro.

Objetivo General

Evaluar la formación de la capa de apatita en un biovidrio sintetizado directamente de cenizas de cáscara de arroz, utilizadas como fuente de SiO_2 .

Objetivos específicos

- Obtener el SiO_2 a partir de la cáscara de arroz, caracterizarlo por Fluorescencia de Rayos X y realizar el ajuste a los porcentajes de la formulación original del biovidrio.
- Sintetizar un biovidrio a partir del uso directo de las cenizas cáscara de arroz como fuente de SiO_2 .
- Caracterizar el biovidrio mediante los análisis de fluorescencia de rayos X (FRX), análisis de superficie, espectroscopía Raman, microscopía óptica, microscopias electrónicas SEM, TEM, HRTEM y difracción de electrones.
- Obtener la porosidad total y tamaño de poro de los materiales obtenidos.
- Realizar pruebas de inmersión en disolución fisiológica simulada a 4 semanas.
- **Verificar la presencia de la capa de apatita** sobre el material por microscopia óptica, electrónica SEM y TEM, mapeo químico y

espectroscopía Raman.

- Comparar los resultados de formación de capa de apatita del material experimental con los de un material comercial (PerioGlas®).

Tipo de estudio

Experimental.

Variables

Variables dependientes: formación de la capa de apatita sobre el biovidrio.

Variables independientes: biovidrios sintetizados a partir de SiO₂ de cáscara de arroz.

Criterios

Inclusión

Se emplearán muestras de los Biovidrios sintetizados a partir de SiO₂ de cáscara de arroz y muestras de PerioGlas® Novabone.

Exclusión

Muestra de Biovidrios diferentes a los sintetizados a partir SiO₂ de cáscara de arroz o cuya composición este fuera del intervalo establecido.

Eliminación

Muestras de Biovidrios sintetizados a partir de SiO₂ de cáscara de arroz que no presenten resultados positivos en la formación de capa de apatita, o que su método de síntesis resulte más complejo.

Muestras obtenidas en polvo o granulado.

Materiales

Reactivos

- SiO_2 obtenido a partir de la ceniza de cáscara de arroz
Sigma Aldrich
- Na_2CO_3 CAS 497-19-8 99.95-100.5% Puro
- CaCO_3 CAS 471-34-1 99.95-100.5% Puro
- P_2O_5 CAS 1314-56-3 >- 98 % Puro
- NaHCO_3 CAS 144-55-8 99.95-100.5 % Puro
- NaCl CAS 7647-14-5
- KCl CAS 7447-40-7 >- 99.0 % Puro
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CAS 16788-57-1 >- 99.0 % Puro
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CAS 7791-18-6 99.95 % Puro
- CaCl_2 anhidro CAS 10043-52-4 >-96.0 % Puro
- Na_2SO_4 CAS 7757-82-6 > -99.0 % Puro
- *TRISMA (tris(hidroximetil)-aminometano ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) FW12-1477-86-1*
99.0 % Puro

Otros:

- *HCl CAS7647-01-0 Fulka Analytical*
- Glicerol anhidro CAS 5681-5 J.T.BAKER
- PerioGlas® Novabone
- Agua destilada

Material

- Vasos de precipitado de vidrio de 2L, 500 y 50mL
- Vasos de precipitado de **Nalgene**® 1L, 250 mL
- Agitadores magnéticos
- Espátulas de polvos
- Crisol de porcelana

- Botes de plástico con tapa
- Papel *Parafilm*
- Alambre de ortodoncia
- Termómetros
- Guantes de asbesto
- Guantes de carnaza
- Pinzas
- Placa de asbesto
- Soporte Universal
- Pinzas y nueces

Equipo

- Plato de calentamiento con agitación magnética digital Corning PC420D
- Cámara de guantes LABCONCO 50004
- Mufla para calcinado digital FELISA FE360
- Campana de extracción VECO Grado
- Incubadora con agitación INCU- SHAKER marca Benchmark
- Microscopio Electrónico de Barrido JSM5600LV (resolución 3.0 nm) equipado con micro sonda marca NORAN para realizar análisis químicos por EDS
- Microscopio Electrónico de Transmisión JEM2101FEG resolución 0.19 nm) equipado con micro sonda marca NORAN para realizar análisis químicos por EDS
- Microscopio Carl Zeiss Axio Scope. A1 con un objetivo de 10X campo claro y oscuro
- Equipo de espectroscopía Raman, Witec con Microscopio Confocal Alfa 300R con una fuente de excitación de 532 nm
- Equipo para Difracción de Rayos X Siemens D500
- Un sistema automatizado de sorción de gas Quantachrome (Autosorb-1)

Métodos

Técnicas de caracterización

Fluorescencia de rayos X (FRX)

El análisis químico se realizó con un espectrómetro Siemens SRS 300, el cual fue equipado con un anticátodo Rh para ventana de 125 μ m. El análisis se realiza en perlas de vidrio obtenidas por la fusión de la mezcla de 0.8g de muestra con 7.2g de fundente (el fundente está constituido por $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ y Li_2BO_2 ultra puro en relación 1:1, se utiliza en forma granular para favorecer el llenado del crisol y evitar pérdidas durante el enfriamiento) a 1000 ° C durante 10 min de acuerdo a referencias geoquímicas. Se utilizó como agente no mojante LiBr en disolución acuosa a una concentración de 250 g/L.

Difracción de rayos X (DRX)

Las muestras se midieron en un equipo Siemens D500, con una longitud de onda $\text{Cu K-}\alpha_1=1.5406^{\text{a}}$ utilizando el método de polvos. En un intervalo de 10-70° El tamaño de paso fue de 0.02° y el tiempo de paso de 1.8s.

Espectroscopía Raman

Los espectros Raman se registraron usando un equipo Witec con Microscopio Confocal Alfa 300R con una fuente de excitación de 532 nm (Nd: doble frecuencia YVO4 láser) y con el objetivo 50X, 0,9 NA para enfocar el láser en la muestra y recoger la luz retro dispersada en una configuración de 180 grados. Para la adquisición de espectros se utilizaron los siguientes parámetros; resolución 4 cm^{-1} , fuente de láser de 30 mW, tiempo de integración 0,1 s y 20 acumulaciones.

Microscopía electrónica

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se usó un equipo TEM JEM 2010 FEG con resolución punto a punto de 0,19 nm, para analizar los fosfatos de calcio. Para los estudios TEM, los precipitados de fosfato de calcio se suspendieron en alcohol isopropílico y se dispersaron en un baño de ultrasonido; una gota se colocó sobre rejillas de cobre de 300 mesh cubiertas con carbono. La morfología y la información cristalográfica se obtuvieron usando alta resolución en un Microscopio Electrónico de Transmisión (HRTEM) con un voltaje de aceleración de 200 kV. Para analizar la estructura cristalina de las muestras se utilizó software "Digital Micrograph". Las distancias interplanares medidas se compararon con la de hidroxiapatita estándar (ICDD 44-0778. 2001).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología, microestructura y composición química elemental de los fosfatos de calcio se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (JSM 5600 LV). Las muestras fueron fijadas sobre un porta-muestras de aluminio con cinta de carbono. El análisis elemental SEM se realizó a un voltaje de aceleración de 20-25 kV y a una presión de 20-25 Pa en la cámara de muestra, en diferentes zonas con diferentes tamaños de sondas. La relación calcio-fosforo (Ca / P) se calcula a partir de la intensidad de los picos en el patrón de EDS y el análisis semi-cuantitativo, se obtuvo usando un detector de microanálisis EDS (de rayos X Noran, modelo Voyager 4.2.3.)

Área superficial y porosidad

Los parámetros texturales se obtuvieron usando un sistema automatizado de sorción de gas Quantachrome (Autosorb-1). Inicialmente las muestras se desgasifican a 300 °C. Posteriormente se obtiene la isoterma de adsorción-desorción de N₂. A partir del cual se determina el tamaño de poro que se establece a partir de los datos de desorción, de acuerdo con el método de Barret, Joyner y Halenda (BJH) y el área superficial de acuerdo con el método de Brunauer, Emmett y Teller (BET).

Microscopía óptica

Las imágenes de microscopía óptica fueron adquiridas utilizando un microscopio Carl Zeiss modelo Axio Scope A1 con un objetivo de 10X en observación de campo claro y oscuro.

Porosidad total

Para la determinación de la porosidad total de los materiales B22, 27, 29, 30, 31 y 32 se utilizó el Principio de Arquímedes.

$$\Pi_{total} = 1 - \frac{\rho_{andamio}}{\rho_{material}} \times 100$$

Dónde:

- **$\rho_{andamio}$** se determina por el peso del sólido poroso entre el volumen desplazado al sumergirlo en un volumen conocido de agua
- **$\rho_{material}$** se determina por el peso del material molido en un mortero de ágata entre el volumen desplazado al sumergirlo en un volumen conocido de agua.

Fig 4. Representación gráfica del Método de Arquímedes. a)Material molido, b) Material ya pesado y colocado en la probeta, c)Volumen conocido de agua, d)Agua y solido juntos, e)Cambio de volumen de agua



Materia prima

La cáscara de arroz, de la Arrocería Covadonga S.A., es lavada en 10 ciclos con agua corriente, tostada, molida y calcinada a 500 °C por 24 horas. Obteniéndose ceniza de cáscara de arroz conocida como RHA, por sus siglas en inglés Rice Hull Ash.

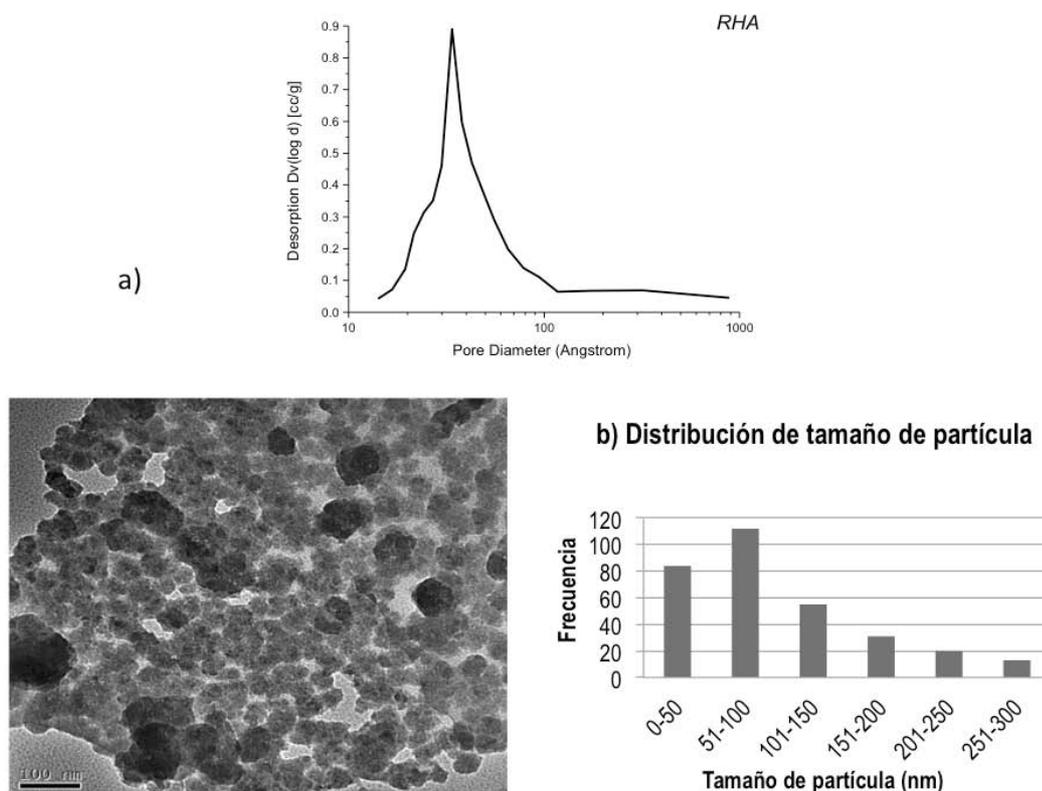
La ceniza obtenida se analizó por fluorescencia de rayos X, una vez considerada la pérdida por calcinación se obtuvieron los datos reportados en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de la ceniza de cáscara de arroz, obtenida mediante Fluorescencia de Rayos X.

Compuesto	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ t	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅
% en peso	96.238	0.002	0.455	0.373	0.184	0.66	0.75	0.299	0.641	3.96

Posteriormente se determinaron las propiedades superficiales de la ceniza, caracterizándose ésta como un material mesoporoso con un área superficial BET de 243.21 m²/g (Figura 4a). Mientras que por TEM, y el programa digital micrograph se midieron los diámetros de 350 partículas y se analizó la distribución de los tamaños. Obteniendo una media dentro del intervalo 50 a 100 nanómetros, dispuestas en cúmulos de formas ovales y circulares más o menos homogéneas (Figura 4b).

Fig 5. Caracterización de la ceniza de cáscara de arroz RHA, distribución de tamaño de poro (a) y partícula (b).



Por otro lado la composición de la ceniza de cáscara de arroz puede variar de acuerdo con el tiempo de cosecha o la zona geográfica de la que es obtenida, en el presente trabajo se utilizaron dos tipos de cáscara de arroz, de arrocería Covadonga (RHA-C2) y de arrocería San José (RHA-SJ) con fines comparativos (Tabla 2).

Tabla 2. Composición química de la ceniza de cáscara de arroz de los lotes RHA-C2 y RHA-SJ, obtenidos por medio de Fluorescencia de Rayos X.

Compuesto/ % en peso	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ t	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅
(RHA-C2)	93.813	0.022	0.001	0.098	0.132	0.521	0.764	0.001	0.261	0.277
(RHA-SJ)	95.659	0.019	0.001	0.119	0.071	0.351	0.731	0.001	0.082	0.073

Ajuste de las proporciones del biovidrio

Las formulaciones de los biovidrios son muy variadas y algunas de sus propiedades varían de acuerdo a dicha composición. Se tomaron como referencia dos formulaciones con diferente contenido de sílice, biovidrio 45S5 y 55S, de las que se ha reportado su uso clínico (Tabla 3). Esto con el objeto de tener un intervalo considerable en el que las composiciones de los biovidrios experimentales pudieran caer. Se realizó la equivalencia en la tabla de porcentajes considerando que los biovidrios de referencia son compuestos de alta pureza.

Atendiendo a su alto contenido en sílice, la ceniza de cáscara de arroz se utilizó como fuente de sílice, mientras que por su bajo contenido de Ca, Na y P, se utilizaron reactivos de alta pureza para alcanzar la composición deseada (Tabla 3). Para esto se utilizaron carbonatos de sodio y calcio, y pentóxido de fósforo, de alta pureza.

Tabla 3. Porcentajes referencia del contenido del biovidrio, cantidad en peso necesaria para la preparación de 1g de biovidrio.

Componente	SiO ₂	Na ₂ O	CaO	P ₂ O ₅
Referencia menor, biovidrio 45S5 (%)	45	24.5	24.4	6.1
Cantidad en peso (g)	SiO ₂ RHA 0.4676	0.2431	0.2362	0.0569
Referencia mayor, 55S (%)	55.1	20.1	22.2	2.6

Obtención de los biovidrios experimentales

Inicialmente, en base a resultados previos reportados ^{12, 88}, se mezcla la ceniza de cáscara de arroz con glicerol y se somete a un proceso de depolimerizado con la finalidad de obtener un gel café traslúcido. Este gel, posteriormente se utiliza como medio de dispersión para los componentes restantes, Na, Ca y P, resultando un gel grisáceo. Cuando este gel se analiza por temogravimetría se observa una pérdida de peso considerable entre 500 y 700°C, que puede asignarse al intervalo de temperatura correspondiente a la pérdida de carbón. De aquí que se determinaron como temperaturas de calcinación, 500 y 700°C.

Para la preparación de los biovidrios se realizaron diferentes pruebas de integración de los componentes con la finalidad de obtener la composición deseada. Para esto, se tomo como base el proceso de depolimerización de la sílice de RHA a 200°C por 2 horas y se fueron ajustando diferentes parámetros experimentales. Los parámetros que se variaron fueron; el tiempo de depolimerizado, la temperatura de incorporación de reactivos, orden de mezcla, proceso de eliminación del glicerol, espumado, tiempo y temperatura de calcinación.

En una primera serie de experimentos (muestras B1-B3, B6) se mezcla la RHA y todos los reactivos (carbonatos de calcio y sodio, y pentóxido de fósforo) con glicerol, con agitación constante a 200°C por 2 horas. Posteriormente se elimina el exceso de glicerol y se lava el gel obtenido, acorde a la Tabla 4. Finalmente el sólido obtenido se calcina a 500°C por 2 horas

Tabla 4. Preparación de muestras por incorporación de los componentes en una sola etapa, primera serie de experimentos.

Muestra	Eliminación de exceso de glicerol	Lavado del gel
B1	Centrifugado a 10000 rpm por 20 min	Con agua 2 veces a 10000 rpm por 20 min
B2	Centrifugado a 5000 rpm por 15 min	Con agua 3 veces a 5000 rpm por 15 min
B3	Centrifugado a 5000 rpm por 20 min	Con agua 1 vez a 5000 rpm por 20 min

B6	Centrifugado a 5000 rpm por 20 min	Con metanol 1 vez a 5000 rpm por 20 min Secado posterior a 80°C por 12 horas.
----	------------------------------------	--

En una segunda serie de experimentos (B4, B5, B7-B11) se mantiene el proceso de depolimerización con glicerol a 200°, variando la secuencia de incorporación de reactivos acorde a la tabla 5. Se implementa la eliminación del glicerol por sedimentación y decantación, con una posterior calcinación de las muestras obtenidas a 500°C por 2 horas.

Tabla 5. Efecto del orden de incorporación de reactivos y de la eliminación de glicerol en la preparación de muestras, segunda serie de experimentos.

Muestra	Primera incorporación de sólido	Segunda incorporación de sólido	Tercera incorporación	Eliminación de exceso de glicerol
B4	RHA + Glicerol 2 Hrs/ 200°C	Calcio + Sodio+ fósforo 1 Hrs/200°C		Lavado con agua a 3000 rpm por 20 min.
B5	RHA + Calcio + Glicerol 2 Hrs/ 200°C Lavado dos veces a 5000 rpm por 20 min.	Sodio y Fósforo 15 min/20°C		Secado a 80°C Sedimentado 2 días Decantación
B7	RHA + Calcio + Glicerol 30 min/ 200°C	Sodio 90 min/200°C	Fósforo 60°C/10 min	Sedimentado 3 días Decantación
B8	RHA + Glicerol 30 min/200°C +Calcio x 1 Hr, 30min/200°C	Sodio + Fósforo 60°C/ 10 min		Sedimentado 2 días Decantación
B9	RHA + Glicerol 1 Hr/ 200°C	Calcio 1 Hr/ 200°C	Sodio + Fósforo 60°C	Sedimentado 3 días Decantación
B10	RHA + Sodio soln. Aq. 20 min/ 20°C Decantado exceso de agua	Calcio + Glicerol 2 Hr/ 200°C	Fósforo 60°C	Sedimentado 3 días Decantado
B11	RHA + Glicerol 1 Hr/ 200°C	Calcio 1 Hr/ 200°C	Sodio, 30 min/ 60°C Fósforo, 30 min/ 60°C	Sedimentado 3 días Decantado Centrifugado a 1000 rpm

En una tercera serie de experimentos se incrementa el tiempo de la depolimerización con la finalidad de obtener una sílice más reactiva que permita favorecer la incorporación de los reactivos. Con base a los resultados obtenidos previamente se fija el proceso de incorporación de los reactivos, temperatura, tiempo y orden, de acuerdo a la Tabla 6. Se prescinde de la etapa de eliminación de exceso de glicerol y las muestras se calcinan directamente a diferentes tiempos y temperaturas.

Tabla 6. Efecto de la temperatura de calcinación en la preparación de muestras, tercera serie de experimentos.

Muestra	Secuencia de incorporación de reactivos	Calcinado
B12	RHA + Glicerol, 10 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Sodio x 30 min/ 60°C Fósforo x 30 min/ 60°C	500°C/ 2 h 4°/min
B19	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Sodio x 30 min/ 110°C Fósforo x 30 min/ 60°C	500°C/ 2 h 4°/min
B20	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Sodio x 30 min/ 110°C Fósforo x 30 min/ 60°C	700°C/ 2 h 4°/min
B21	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Sodio x 30 min/ 110°C Fósforo x 30 min/ 60°C	500°C/ 3 h 4°/min
B22	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Sodio x 30 min/ 110°C Fósforo x 30 min/ 60°C	700°C/ 3 h 4°/min

Por otra parte, con la finalidad de conocer el efecto del sodio se preparan las muestras B23, B24, B25 y B26 en ausencia de sodio, acorde a la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de muestras sin sodio.

Muestra	Secuencia de incorporación de reactivos	Calcinado
B23	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C Calcio x 1 Hr/ 200°C Fósforo x 30 min/ 60°C	500°C/ 2 h 4°/min

B24	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	700°C/ 2 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C	4°/min
	Fósforo x 30 min/ 60°C	
B25	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	500°C/ 3 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C	4°/min
	Fósforo x 30 min/ 60°C	
B26	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	700°C/ 3 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C	4°/min
	Fósforo x 30 min/ 60°C	

Adicionalmente, con la finalidad de incrementar la presencia de andamios se agregan dos métodos previamente reportados ⁸ ¡Error! Marcador no definido.,⁸⁹; la presencia de surfactante y la agitación a altas velocidades con propela mecánica (Tabla 8). Para lo cual se utiliza como surfactante Lauril sulfato de sodio, llevando a cabo la agitación con propela a 4000 rpm. La adición del surfactante se llevo a cabo a aprox 5°C con una agitación constante durante 20 min.

Tabla 8. Efecto de la presencia de surfactante y/o agitación con propela en la preparación de muestras.

Muestra	Secuencia de incorporación de reactivos	Tipo de agitación	Calcinado
B13	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con surfactante y propela	500°C/ 2 h 4°/min
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B14	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con surfactante y propela	700°C/ 2 h 4°/min
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B15	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con surfactante y propela	500°C/ 3 h 4°/min
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B16	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con surfactante y propela	700°C/ 3 h 4°/min
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B27	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con Propela	700°C/ 3 h 4°/min
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		

B28	RHA + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Con Propela	700°C/ 3 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		4°/min
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
	Sin sodio		

Después de la caracterización de estos materiales y de las pruebas in vitro, se determinó que los métodos de síntesis que dieron resultados favorables fueron los establecidos para las muestras B22 y B27. Con la finalidad de asegurar que los resultados son reproducibles, con diferentes lotes y tipos de cáscara de arroz, se tomaron los métodos utilizados para la síntesis de dichas muestras con un lote diferente de ceniza de cáscara de arroz. De la arrocería Covadonga (RHA-C2) generando los biovidrios B29 y B30, y de la arrocería San José (RHA-SJ) generando los biovidrios B31 y B32 (Tabla 9).

Tabla 9. Preparación de muestras a partir de diferentes lotes de cáscara de arroz, arrocería Covadonga (RHA-C2) y arrocería San José (RHA-SJ) .

Muestra	Secuencia de incorporación de reactivos	Condiciones de Espumado	Calcinado
B29	RHA-C2 + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Ninguna	700°C/ 3 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		4°/min
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B30	RHA-C2 + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Espumado con agitación a 4000 rpm por 20 min	700°C/ 3 h
	Calcio, 1 Hr/ 200°C		4°/min
	Sodio, , 30 min/ 110°C		
	Fósforo, , 30 min/ 60°C		
B31	RHA- SJ + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Ninguna	700°C/ 3 h
	Calcio x 1 Hr/ 200°C		4°/min
	Sodio x 30 min/ 110°C		
	Fósforo x 30 min/ 60°C		
B32	RHA-SJ + Glicerol, 9 Hr/ 200°C	Espumado con agitación a 4000 rpm por 20 min	700°C/ 3 h
	Calcio, 1 Hr/ 200°C		4°/min
	Sodio, , 30 min/ 110°C		
	Fósforo, , 30 min/ 60°C		

Prueba de Bioactividad “*in vitro*”, Inmersión de los biomateriales en disolución fisiológica simulada

Preparación de la disolución

Después de probar los diferentes métodos se encontró que el más consistente y adecuado es el descrito en el protocolo de Kokubo en 2006²⁷, siendo éste el utilizado en la preparación de la disolución fisiológica para las pruebas de inmersión y descrito a continuación.

Inicialmente, se prepara un sistema de baño María utilizando un plato de calentamiento con agitación magnética y un vaso de precipitado de 2.5 L con un agitador magnético y aproximadamente 1.5 L de agua corriente. Para la preparación de 1000 mL de disolución se usa un vaso de precipitado marca Nalgene sin ralladuras evidentes, se colocan 700mL de agua destilada y un agitador magnético, el vaso se cubre con parafilm. Se coloca, con un soporte universal, un termómetro dentro del vaso de la disolución con la finalidad de monitorear en todo momento la temperatura del sistema.

El agua de la disolución se calienta a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ con agitación constante. Una vez alcanzada la temperatura se estabiliza el sistema y se comienzan a agregar los reactivos, en muy pequeñas cantidades cuidando de tener una disolución total de cada porción antes de agregar más cantidad. Siendo el orden de adición de los reactivos el siguiente:

- 1) 8.035g de cloruro de sodio, NaCl (99.5% puro)
- 2) 0.355g de bicarbonato de sodio, NaHCO₃ (99.5% puro)
- 3) 0.225g de cloruro de potasio, KCl (99.5% puro)
- 4) 0.231g de fosfato dipotásico de hidrógeno trihidratado, K₂HPO₄·3H₂O (99% puro)
- 5) 0.311g de cloruro de magnesio hexahidratado, MgCl₂·6H₂O (98% puro)
- 6) 39mL de ácido clorhídrico, HCl 1M
- 7) 0.292 de cloruro de calcio, CaCl₂ (95% puro)
- 8) 0.072g de sulfato de sodio, Na₂SO₄ (99% puro)

En este punto se coloca un electrodo de medición de pH en la disolución y se verifica que el pH sea menor a 2.0 ± 0.1 . Antes de agregar el siguiente reactivo, la temperatura debe estar en $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sin llegar a ser mayor a 38°C . Si el volumen de la disolución es menor a 900mL se agrega agua destilada para mantener este volumen. Se continúa con la adición del siguiente reactivo.

9) 6.118g tris(hidroximetil) aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (99% puro)

Con la temperatura preferentemente en 36.5°C , oscilando dentro del intervalo 35 y 38°C , el tris (reactivo 9) se agrega en cantidades muy pequeñas, esperando a que se disuelva completamente antes de agregar una cantidad adicional. Al ir agregando el reactivo se debe mantener un pH de 7.3 ± 0.05 y una temperatura de $36.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Es importante controlar el pH ya que el exceso de reactivo puede elevar el pH y favorecer la precipitación de apatita, el pH no debe sobrepasar de 7.45. Para mantener las condiciones de pH y temperatura se agrega el reactivo alternando con HCl, por goteo (≈ 5 mL). El intervalo de pH debe mantenerse entre 7.42 y 7.45, teniendo cuidado de no bajar el pH de 7.40, finalizando la adición del reactivo a un pH exacto de 7.40 y una temperatura de 36.5°C .

Una vez estabilizada la disolución se retira el electrodo de medición enjuagando con agua destilada, que se agrega a la disolución. La disolución obtenida se vierte en un matraz volumétrico, enjuagando el vaso de plástico y vertiendo el agua de enjuague a la disolución. Se enfría la disolución a 20°C y se afora a 1000mL. Se almacena en una botella de plástico con tapa entre -5 y 10°C para usarse durante los 30 días siguientes a su preparación.

La disolución obtenida, antes de usarse en la prueba de inmersión, se lleva a -5°C y se mantiene durante 7 días para corroborar que no se tenga la presencia de algún precipitado.

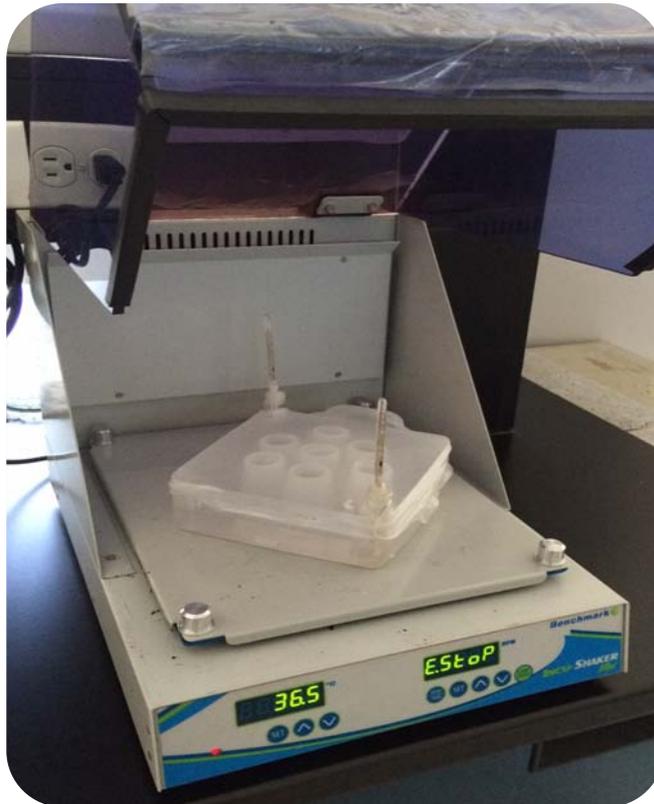
Prueba de inmersión a 4 semanas

Debido a que algunas de las muestras se obtuvieron como polvo, la prueba de inmersión no fue adecuada por la dispersión del sólido en la solución fisiológica, lo que no permitió la identificación de la capa de apatita. De aquí que las muestras utilizadas para esta prueba fueron las obtenidas como sólidos, muestras B13 a B31.

De acuerdo al protocolo de Kokubo.²⁷ la prueba de inmersión en SBF se realiza manteniendo una relación sólido-líquido determinada. Debido a que las muestras obtenidas son materiales sólidos de formas irregulares y densidades variables se realizó una adecuación a dicho protocolo. Para esto, de las muestras obtenidas se cortaron semicírculos con un diámetro aproximado de 19 mm y con un peso similar. Por lo cual el volumen a agregar, de la disolución obtenida SBF, resulto entre 22.5 y 25 mL.

El montaje de las muestras se realizó acorde al protocolo de Kokubo.²⁷ las muestras fueron suspendidas en un recipiente de plástico y sumergidas en SBF. Posteriormente, los recipientes se colocan en un sistema de baño María cerrado, el cual posteriormente se coloca dentro de una mini incubadora con agitación marca Benchmark a una temperatura de $36.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Junto con los recipientes con las muestras, se colocan 3 termómetros sumergidos en agua con la finalidad de monitorear la temperatura del sistema (Fig. 5) Adicionalmente, se coloca un frasco con SBF como control, sin muestra alguna, para descartar la formación de algún precipitado durante el proceso de inmersión. La estabilidad del sistema se monitorea durante las 4 semanas que dura la prueba.

Fig 6. Sistema de temperatura para la prueba de inmersión en SBF.



Identificación de la capa de apatita

Después de las 4 semanas en inmersión los materiales son lavados por goteo con 2 mL de agua destilada, se secan a temperatura ambiente y se procede a realizar la identificación por las diferentes técnicas de caracterización; espectroscopía Raman, microscopía óptica y electrónica. Debido a que la disolución control en la inspección visual no mostró presencia de precipitado, se puede asegurar que el precipitado formado en las muestras se debe a la interacción del material con la SBF.

Resultados y Discusión

Análisis del material control PerioGlas® Novabone

Como material control se utilizó el biovidrio comercial PerioGlas® Novabone (Biovidrio 45S5), con fines comparativos. Esto debido a que este material presenta una composición similar a los materiales sintetizados en este trabajo y se encuentra en uso clínico desde 1985.

Analizando el PerioGlas® Novabone por FRX, se pudo identificar la presencia de elementos traza también presentes en los biovidrios experimentales sintetizados, aunque en proporción diferente (Tabla 10). Debido a que el PerioGlas® Novabone se encuentra en uso clínico y no se han reportado reacciones adversas por la presencia de estos elementos, podemos considerar que la presencia de los elementos traza no afectará la funcionalidad de los materiales sintetizados.

Adicionalmente se analizó el PerioGlas® Novabone por espectroscopía Raman, debido a que es la técnica principal que nos permitió identificar la presencia de apatita en los biovidrios experimentales después de su inmersión en SBF. De forma puntual se analizó la muestra por la técnica Raman antes y después de 4 semanas en la prueba de inmersión (Fig.7) En el espectro inicial, previo a la prueba de inmersión, se pudo observar la presencia de bandas correspondientes a la HAp, una banda predominante en 1080 cm^{-1} y otra a 960 cm^{-1} . Por lo que podría interpretarse la presencia de núcleos de cristalización desde el material de partida. Posterior a la prueba de inmersión (PG 4S) puede notarse la disminución de intensidad de la banda de 1080 cm^{-1} y el aumento en la intensidad de las bandas de la HAp sobre todo la de 960 cm^{-1} . Es decir que se invierten, lo que puede deberse a la maduración de los cristales a partir de los núcleos existentes.

Fig 7. Espectro Raman del material Perioglas de Novabone antes (PG) y después (PG 4S) de la prueba de inmersión.

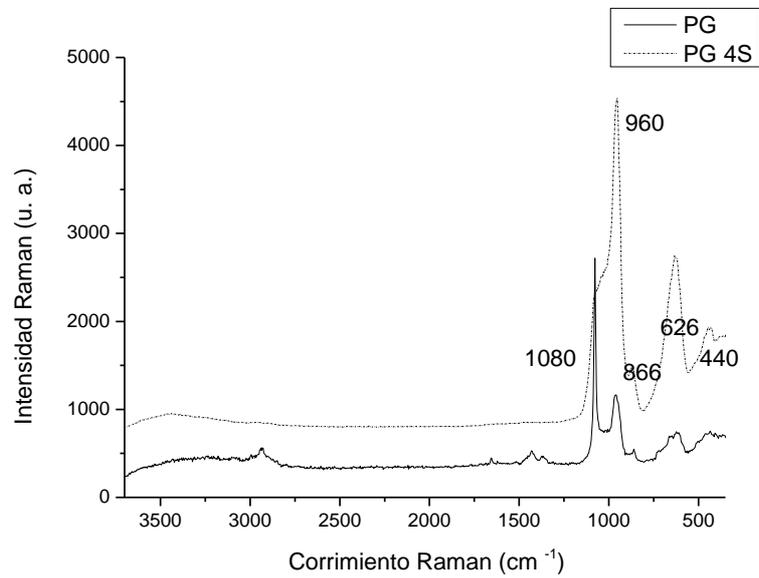


Tabla 10. Composición química del material control obtenido por Fluorescencia de RX.

(% en peso)	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe total	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅
Perio Glas	45.381	0.004	1.106	0.046	0.014	ND	25.095	22.998	0.024	5.332

ND-No determinado

Caracterización de los biovidrios experimentales antes de la prueba de inmersión en SBF

Análisis por Fluorescencia de Rayos X

Inicialmente, se prepararon las primeras muestras (Tabla 4) a partir de la adición simultánea de los componentes al glicerol y su posterior tratamiento térmico, acorde al proceso que se reporta en la literatura tanto para el método tradicional como para el sol-gel. Con la posterior eliminación del exceso de glicerol por centrifugado y lavado con agua. Las muestras obtenidas (muestras B1-B3, B6) se analizaron por FRX mostrando la pérdida de los componentes principales del biovidrio (Tabla 11), lo que fue indicativo de que el método de síntesis no era el adecuado.

De aquí que se procedió a una segunda serie de experimentos (Tabla 5), en la que se varía la secuencia de incorporación de los reactivos y el proceso de eliminación del excedente de glicerol, mejorándose la composición de los materiales obtenidos (B4, B5, B7-B11). Sin embargo, la composición aún se mantiene por debajo de la composición deseada (Tabla 11).

Con base a los resultados obtenidos, se procedió a incrementar el tiempo de depolimerizado y puntualizar las temperaturas de mezclado con el fin de mejorar la incorporación del Na, Ca y P en el gel (Tabla 6). Los resultados obtenidos mostraron que la composición de las muestras B12, B21-B22, muestran una diferencia con la formulación propuesta del Bioglass 45S5 (SiO_2 45%, Na_2O 24.5%, CaO 24.4%, P_2O_5 6.1%), referencia inferior en los porcentajes de composición de sílice. Sin embargo, el análisis químico muestra que la composición obtenida, para las muestras B21 y B22, se asemeja a la formulación del 55S (SiO_2 55.1%, Na_2O 20.1%, CaO 22.2%, P_2O_5 2.6%), con un incremento \approx 5% en el contenido de fósforo y una disminución de \approx 3% en el contenido de calcio y sodio (Tabla 11).

Considerando que el método utilizado para la síntesis de las muestras B21 y B22 es el adecuado para lograr la composición deseada (mezclado inicial de la sílice con el glicerol a 200°C durante 9 horas con posterior incorporación del calcio a 200°C, sodio a 110°C y, fósforo a 60°C) se utiliza este método para conocer el

efecto de otras variables en la preparación del material. Por lo que con el fin de evaluar el efecto de la ausencia del sodio en las propiedades del biovidrio, se analizaron las muestras B25, B26 y B28 (Tabla 7 y 8) en las que se observa el incremento del contenido de sílice por la ausencia del sodio (Tabla 11). Mientras que las muestras B13-B16 y B27 (Tabla 8) se prepararon con la finalidad de conocer el efecto de la presencia de un surfactante en el material y del efecto de una agitación a alta velocidad. Observándose un ligero incremento en el contenido de fósforo (Tabla 11).

Tabla 11. Composición química de los biovidrios experimentales obtenido por Fluorescencia de RX.

FRX	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ t	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅
B3	51.773	0.011	0.469	0.335	0.136	0.477	41.278	2.835	0.152	2.535
B4	51.469	0.002	0.378	0.173	0.087	0.298	18.222	20.897	0.167	8.307
B5	51.148	0.023	0.790	0.255	0.066	0.496	19.924	20.231	0.164	6.902
B6	49.879	0.025	0.858	0.436	0.138	0.601	44.449	1.429	0.188	1.997
B7	46.033	0.008	1.747	0.310	0.097	0.307	33.795	7.589	0.250	9.865
B8	59.037	0.003	0.035	0.130	0.074	0.003	18.916	17.536	0.196	4.071
B9	57.798	0.008	0.034	0.225	0.087	0.002	19.223	15.375	0.214	7.033
B10	60.386	0.002	0.103	0.288	0.083	0.002	24.251	3.579	0.157	11.148
B11	50.466	0.004	0.169	0.324	0.099	0.002	27.083	7.765	0.231	13.858
B12	56.688	0.001	0.160	0.239	0.101	0.002	16.541	18.513	0.328	7.426
B13	50.501	0.118	0.017	0.168	0.107	0.285	19.762	19.546	0.397	9.099
B14	50.399	0.065	0.010	0.184	0.099	0.240	21.087	19.209	0.357	8.350
B15	48.845	0.079	0.010	0.179	0.106	0.290	23.171	18.246	0.283	8.790
B16	52.079	0.031	0.010	0.135	0.090	0.219	16.898	21.458	0.321	8.758
B21	54.379	0.029	0.010	0.171	0.107	0.274	19.750	17.088	0.320	7.873
B22	54.870	0.054	0.010	0.175	0.106	0.296	19.220	17.362	0.326	7.580
B25	67.922	0.101	0.010	0.198	0.115	0.306	22.173	0.134	0.392	8.648
B26	67.748	0.031	0.010	0.196	0.118	0.391	20.790	0.208	0.444	10.063
B27	55.027	0.241	0.010	0.145	0.105	0.253	18.459	17.357	0.320	8.082
B28	68.074	0.019	0.010	0.167	0.108	0.305	21.210	0.133	0.382	9.591

Por otra parte, debido a que la composición de la ceniza de cáscara de arroz puede variar, dependiendo de la época y zona de cultivo, se llevo a cabo un estudio comparativo con materiales sintetizados a partir de otros lotes de cáscara

de arroz (Tabla 9). El primero, también de la arrocería Covadonga recolectado un año después (RHA-C2), muestras B29, y el segundo de otra región del país, arrocería San José del Estado de Morelos (RHA-SJ), muestras B31. En la tabla 12 se muestra el análisis por FRX de los biovidrios obtenidos y se puede observar que las composiciones obtenidas se encuentran dentro de los intervalos establecidos.

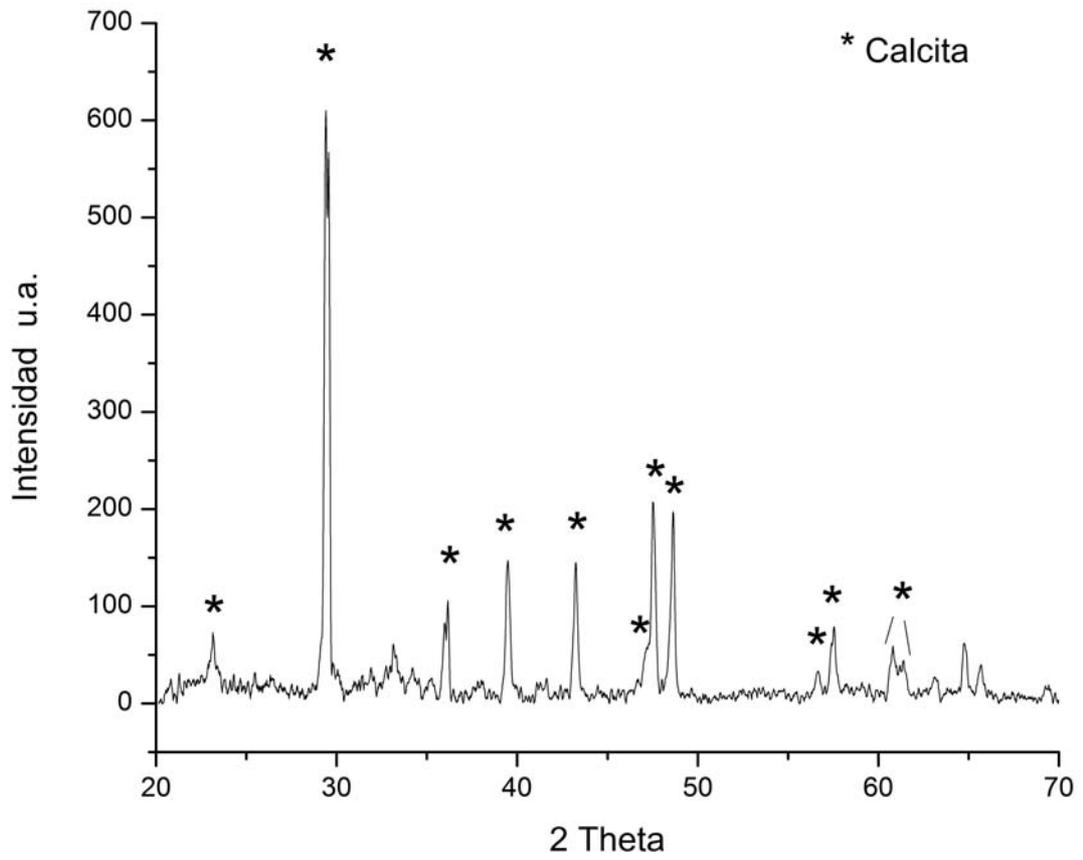
Tabla 12. Comparación del Análisis químico de los biovidrios con el mismo método de síntesis y diferente fuente de ceniza, FRX

Compuesto/ % en peso	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ t	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅
B22	54.870	0.054	0.010	0.175	0.106	0.296	19.220	17.362	0.326	7.580
B29	55.435	0.318	0.001	0.283	0.094	0.394	18.087	17.364	0.313	7.710
B31	57.132	0.319	0.001	0.254	0.054	0.480	18.025	16.161	0.232	7.342
Perio Glas	45.381	0.004	1.106	0.046	0.014	ND	25.095	22.998	0.024	5.332

Análisis por Difracción de Rayos X

Los materiales sintetizados fueron analizados por difracción de Rayos X mostrando la presencia de calcita (ICDD 47-1743) y sílice vítrea (halo ancho cerca de $2\theta = 22^\circ$). En la Figura 8 se muestra el patrón de difracción para la muestra B22, las otras muestras mostraron un patrón similar con diferencias en la intensidad de la señal amorfa. Es importante considerar que la calcita es reportada como un material precursor de HAp.^{90, 91}

Fig 8. Patrón de difracción de RX de la muestra B22

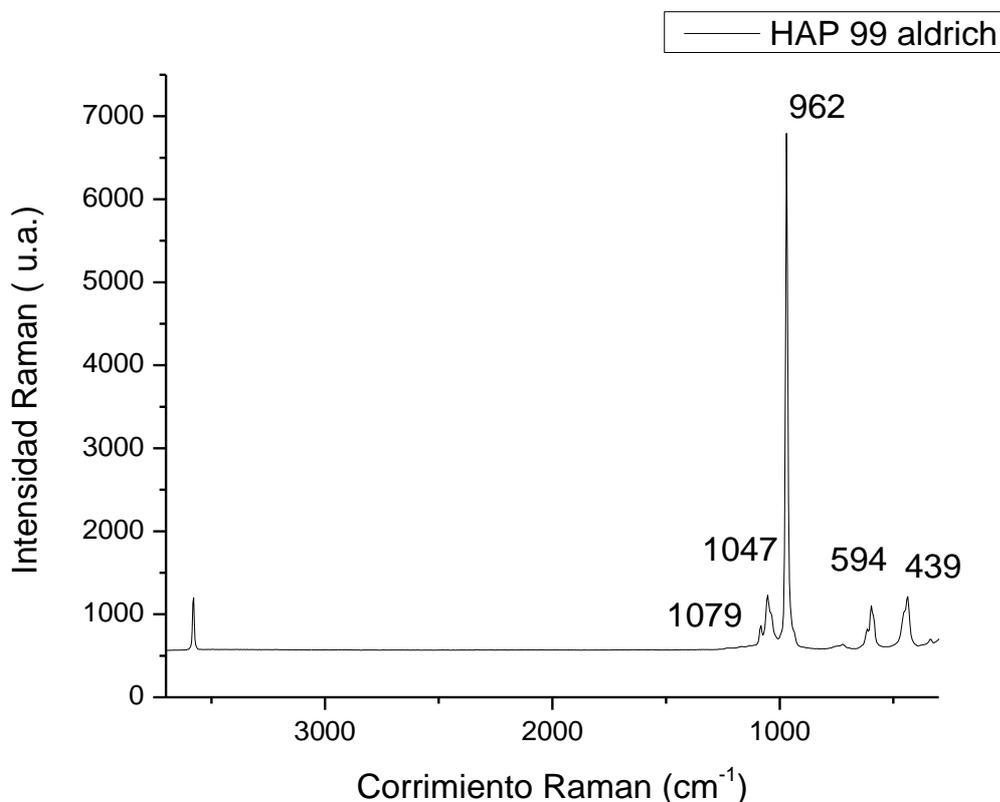


Caracterización de los biovidrios después de la inmersión en SBF

Análisis por Espectroscopía Raman

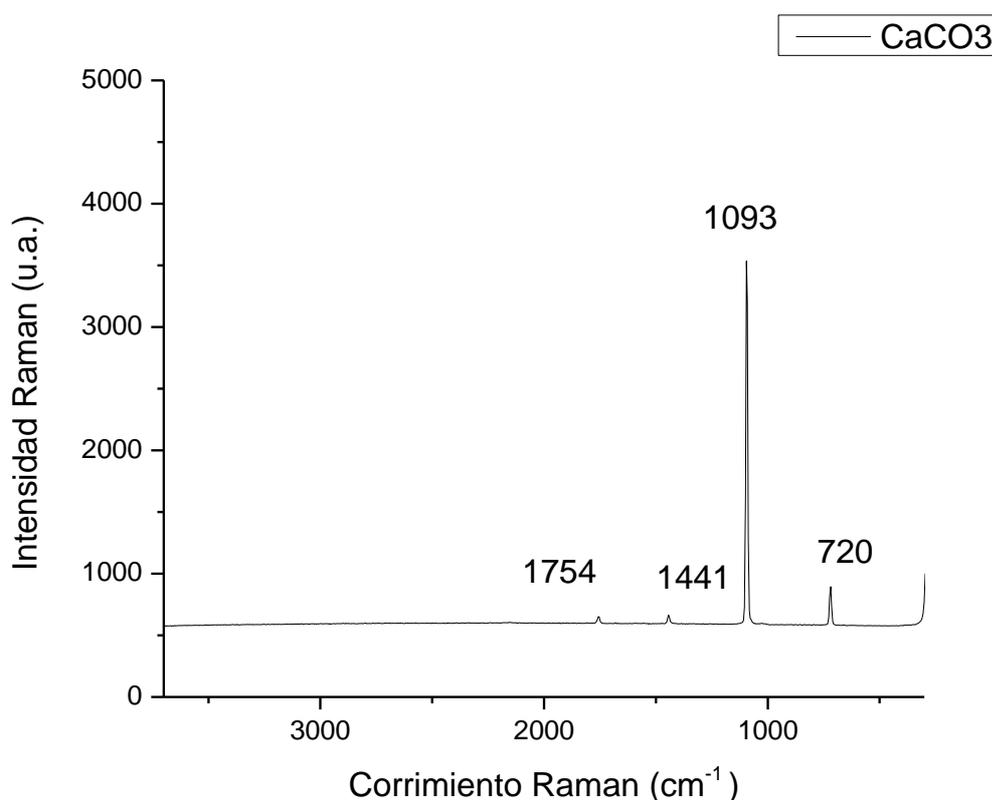
Con la finalidad de llevar a cabo la identificación de la presencia de apatita en los biovidrios experimentales por espectroscopía Raman, después de la prueba de inmersión, se toma como referencia la hidroxiapatita carbonatada pura de la marca Aldrich®. Obteniendo el espectro de la apatita comercial de la marca Sigma-Aldrich, pureza de 99.995%, CAS 12167-74-7, se identifican sus bandas características (Fig. 9). Se observa un espectro dominante con la presencia de una banda intensa centrada a 962 cm^{-1} y un grupo de bandas de intensidad media a 1079 , 1047 , 594 y 439 cm^{-1} correspondientes a los modos normales vibracionales activos en Raman de HAp carbonatada.^{92,93}

Fig 9. Espectro Raman obtenido de la Hidroxiapatita de la marca Aldrich



Adicionalmente se hace la identificación de las bandas RAMAN de calcita (Fig. 10), utilizando como material control calcita de la marca Sigma-Aldrich, pureza de 99 %, CAS 471-34-1. Se obtiene el espectro que muestra una banda intensa a 1093 cm^{-1} , un grupo de bandas de intensidad media en 720 , 1441 y 1754 cm^{-1} que corresponden a los modos normales vibracionales activos en Raman.

Fig 10. Espectro Raman obtenido de la Calcita de la marca Aldrich



Una vez obtenidos los espectros referencia, se caracterizan las muestras B13 a B27 después de la prueba de inmersión en SBF, por espectroscopía RAMAN. Resultando que las muestras libres de sodio (Tabla 7), las calcinadas a 500°C , a excepción de la muestra B15 probablemente por la presencia del surfactante, y las calcinadas a 700°C por 2 horas, no muestran formación de hidroxiapatita. De aquí que las muestras que mostraron formación de la capa de HAp, son las muestras B15, B16, B22 y B27.

En el espectro Raman de punto simple de las muestras B15, B16, B22 y B27, después de 4 semanas de inmersión en SBF, (Fig. 11) se observa un espectro dominante con la presencia de una banda intensa centrada a 965 cm^{-1} y un grupo de bandas de intensidad media a 1047 , 594 y 441 cm^{-1} , que corresponden a los modos normales vibracionales de HAp cristalina y otra en 1079 asignada a hidroxiapatita carbonatada según Kubisz 2007.⁹² Sin embargo, analizando diferentes zonas en la misma muestra se pudo observar una banda adicional a las de la HAp, a 720 cm^{-1} , coincidente con la calcita. También se observó el corrimiento de las bandas posiblemente por la presencia de diferentes fases cristalinas. Así como la presencia de núcleos de crecimiento o cristalización, al notar que en algunas zonas la banda de 1080 , correspondiente los carbonatos o fosfatos de la hidroxiapatita carbonatada (HCAp)^{92,94} se presenta más intensa que la de 954 y después de la prueba de inmersión la intensidad se invierte lo que podría indicarnos la evolución de la cristalización. (Fig. 12)

Fig 11. Espectro Raman comparativo de las muestras sintetizadas y la hidroxiapatita comercial

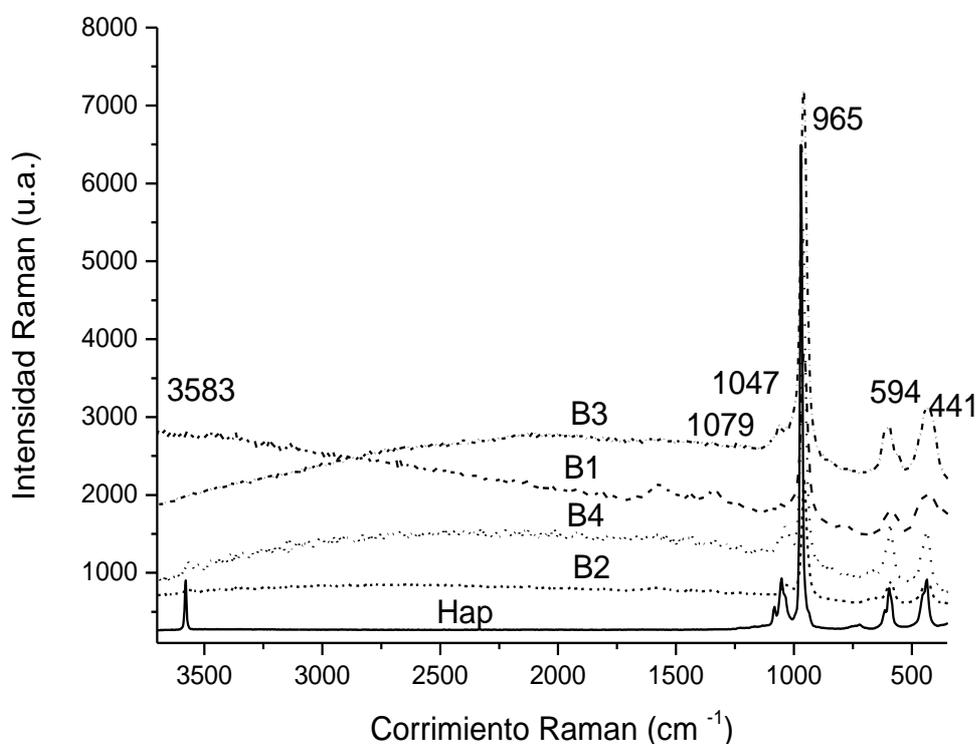
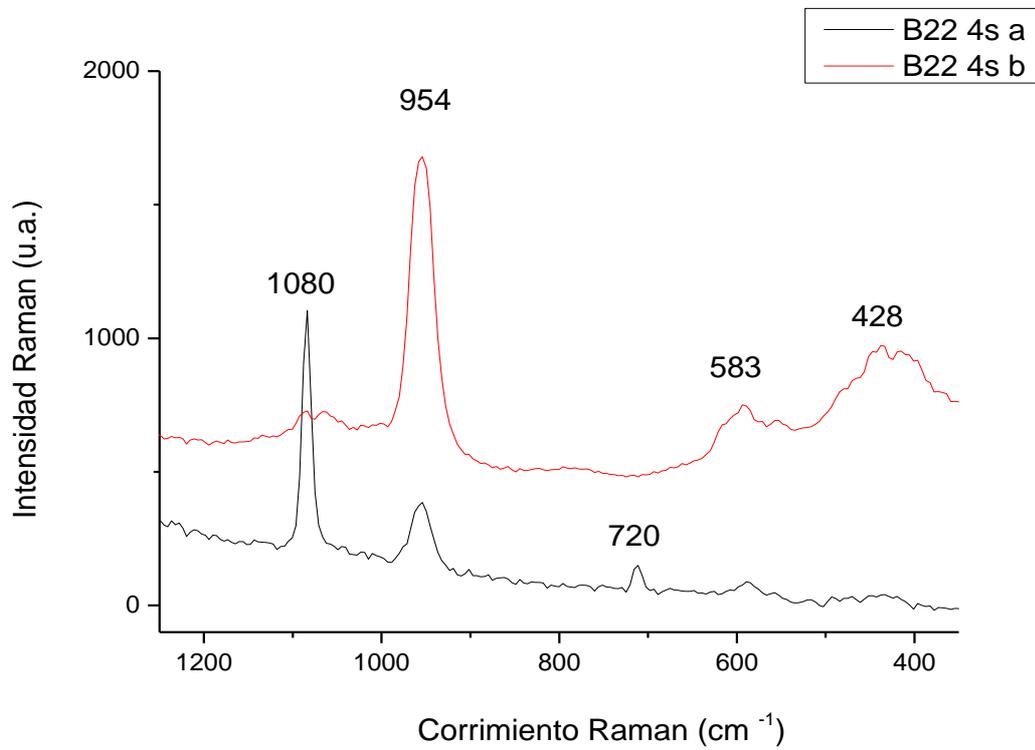


Fig 12. Espectro comparativo de diferentes zonas de la misma muestra B22



Análisis por Microscopía Electrónica

Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

Adicionalmente a la caracterización por Raman, se procedió a caracterizar la muestra B27 por la técnica de HRTEM, obteniéndose imágenes de alta resolución que confirmaron la presencia de apatita, dichas imágenes con resolución atómica presentan estructuras filamentosas características de las apatitas en mayor acercamiento del lado derecho (Fig. 13)

En la figura 14 se presentan mayores acercamientos que permitieron el análisis de la microestructura. Con la ayuda de la transformada de Fourier se midieron las distancias interplanares y los ángulos de las familias de planos cristalinos, obteniéndose los índices de Miller (h,k,l). Teniendo que los resultados de la indexación (Fig. 14) muestran una correspondencia con la estructura del hidróxifosfato de calcio (ICDD 760694) que confirma la presencia de HAp.

Fig 13. Imagen de HRTEM del biovidrio B27.

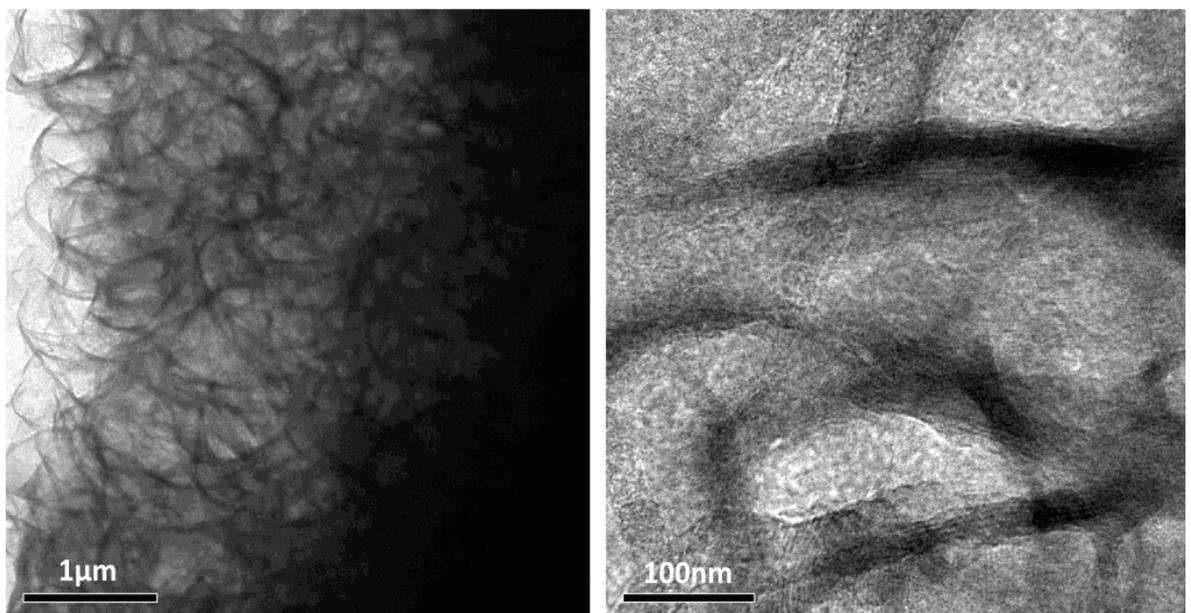
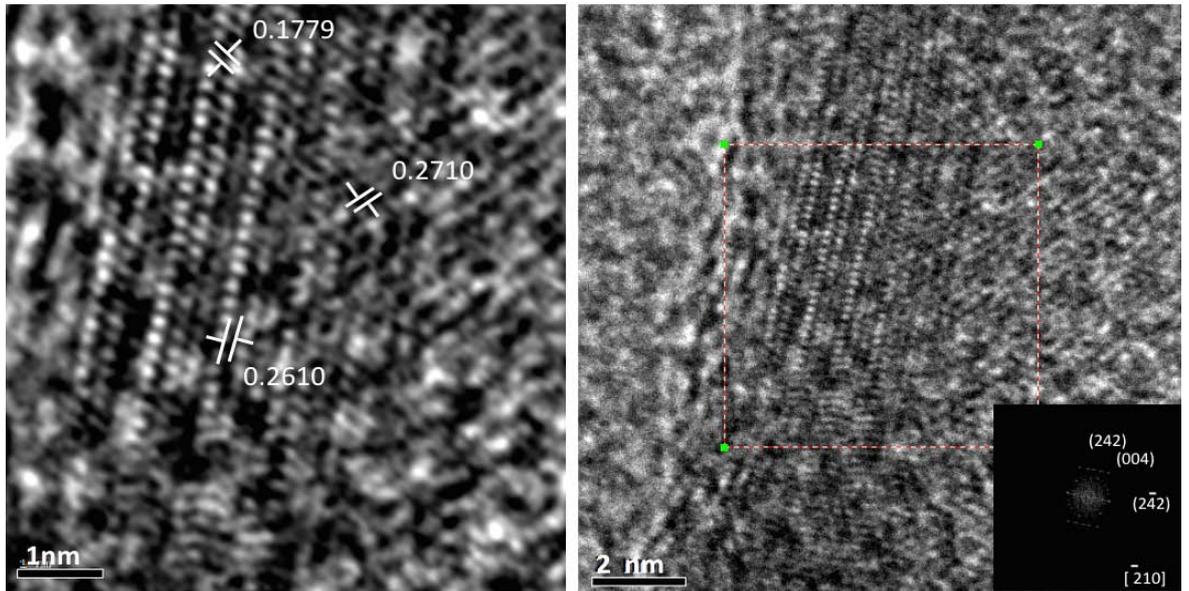


Fig 14. Imagen indexada del biovidrio B27 correspondiente a la ficha ICDD 760694 hidróxifosfato de calcio (HAp)



Microscopia electrónica de barrido SEM, mapeo y análisis elemental por EDS.

De las muestras obtenidas y que resultaron positivas en la formación de la capa de apatita, después de la prueba de inmersión en SBF, se eligió el método de síntesis de la muestra B22 como el método más eficaz y sencillo (Tabla 6). De aquí que, las muestras B29 y B31 se sintetizaron utilizando el mismo procedimiento pero con diferente lote de cáscara de arroz y se sometieron a una caracterización exhaustiva por SEM.

Los análisis realizados por SEM nos indican los cambios en la topografía del material después de la prueba de inmersión. Se observó la formación de cristales de apatita y nos permitió determinar el tamaño de poro del material sólido. En general, antes de la prueba de inmersión, podemos observar estructuras porosas, con poros de diferentes tamaños y formas irregulares (ovalados, redondos y tipo laminillas que separan tridimensionalmente el material) (Figuras 15, 20, y 25). Mientras que después de la prueba de inmersión se pudo observar la formación de cúmulos sobre la superficie del material (Figura 16, 21 y 26). Adicionalmente, con la finalidad de identificar los elementos presentes y reconocer su distribución en el material se analizaron las muestras por EDS (Figuras 17-19, 22- 24, 27-29).

Para la muestra B22, el análisis por SEM nos permite identificar un material poroso y rugoso antes de la prueba de inmersión (Figura 15). Mientras que, después de la prueba de inmersión se puede observar la formación de un nuevo material en forma de cúmulos. La figura 16 muestra un acercamiento a una porción de los cúmulos en la superficie, la cual se utiliza para llevar a cabo un análisis elemental por EDS (Figura 17).

En la figura 17 podemos observar la composición de los cúmulos formados, porcentaje en peso y atómico de los elementos encontrados. De aquí que es posible calcular la proporción Ca/P en los cúmulos, resultando de 1.75, valor correspondiente a un fosfato de calcio ($1.6 \leq \text{Ca/P} \leq 1.7$). Lo que nos permite concluir que los cúmulos corresponden a la formación de hidroxiapatita en el material, sustentado en los análisis previos.

Fig 15. Imagen SEM del biovidrio B22 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x.

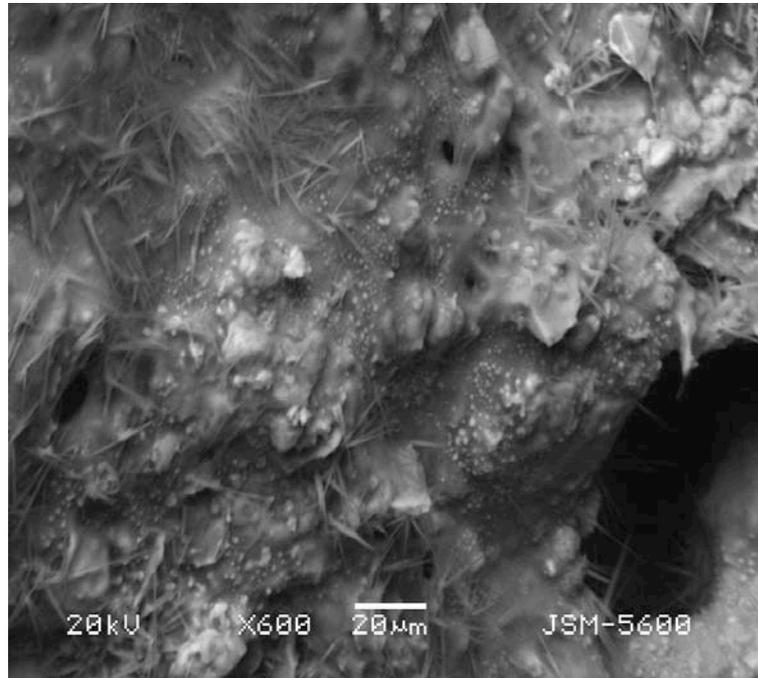


Fig 16. Imagen SEM del biovidrio B22 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x.

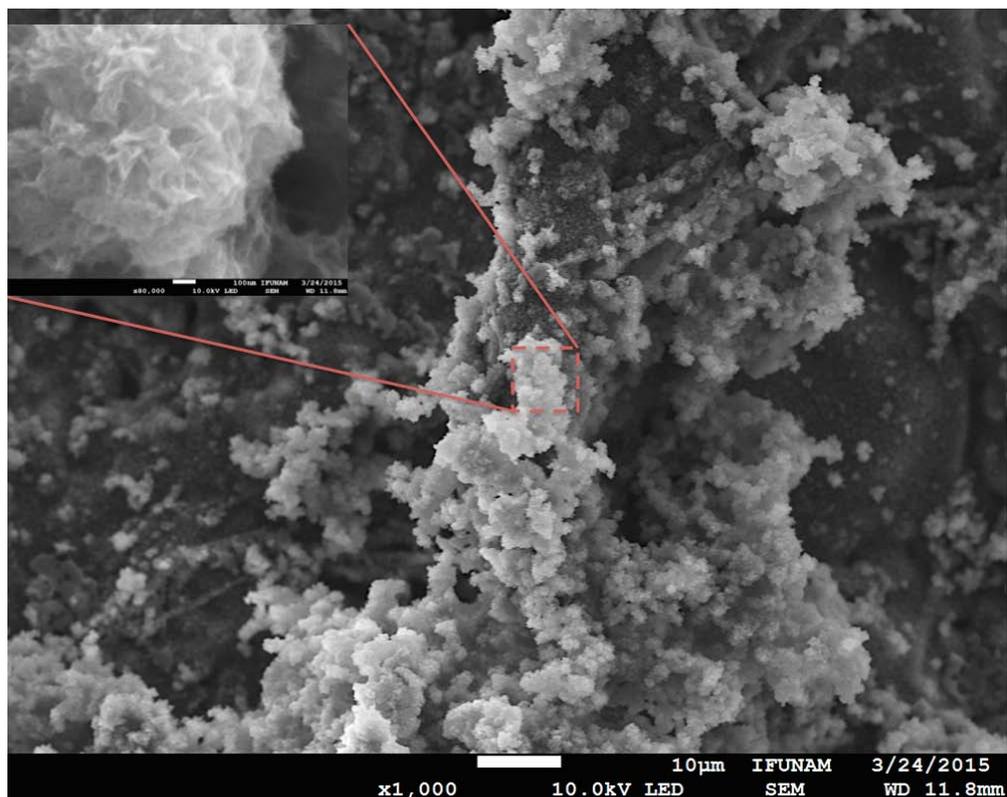
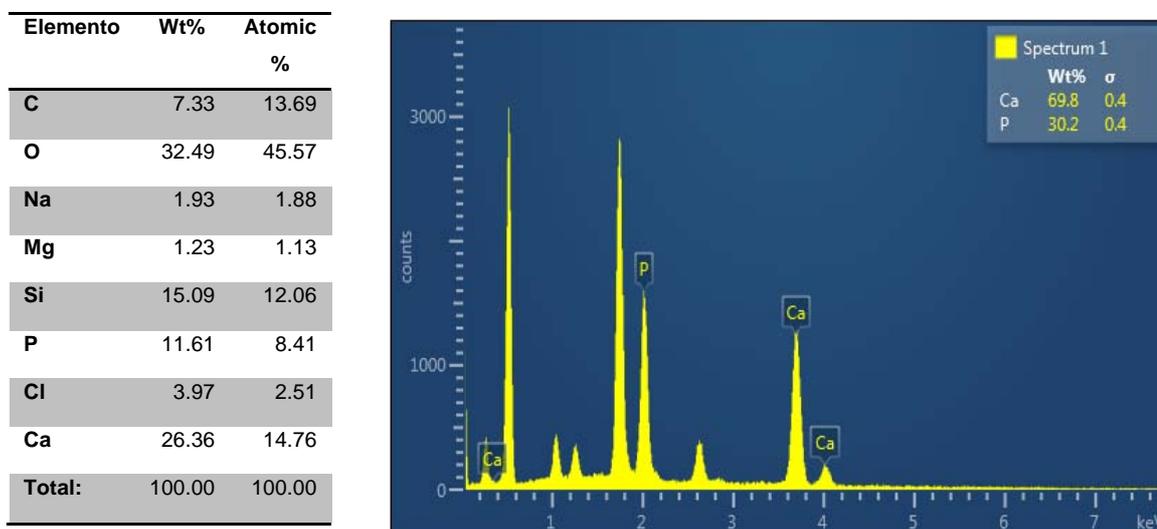
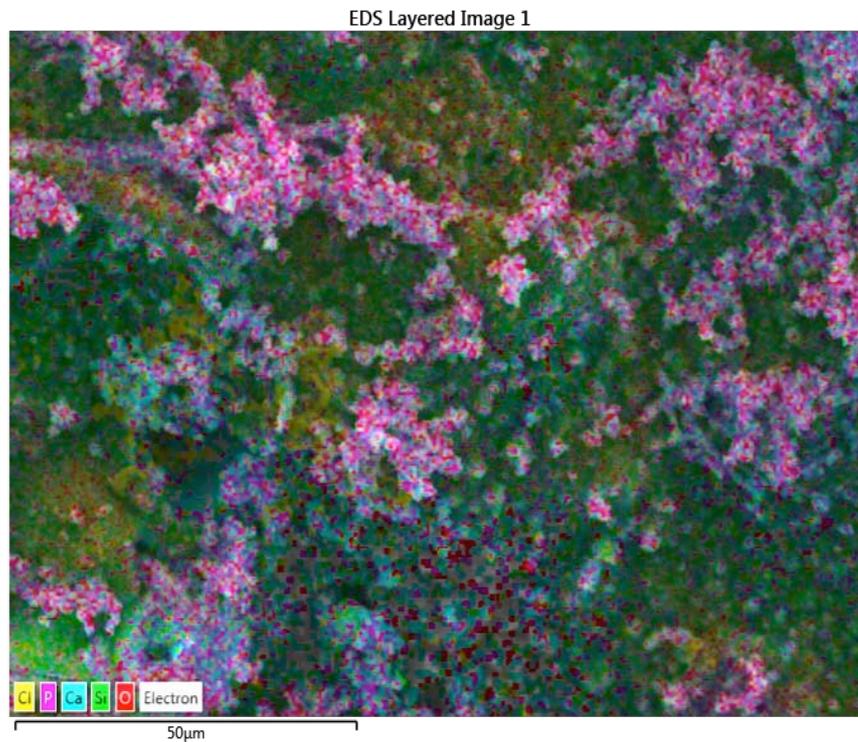


Fig 17. Elementos presentes en la muestra del biovidrio B22 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS.



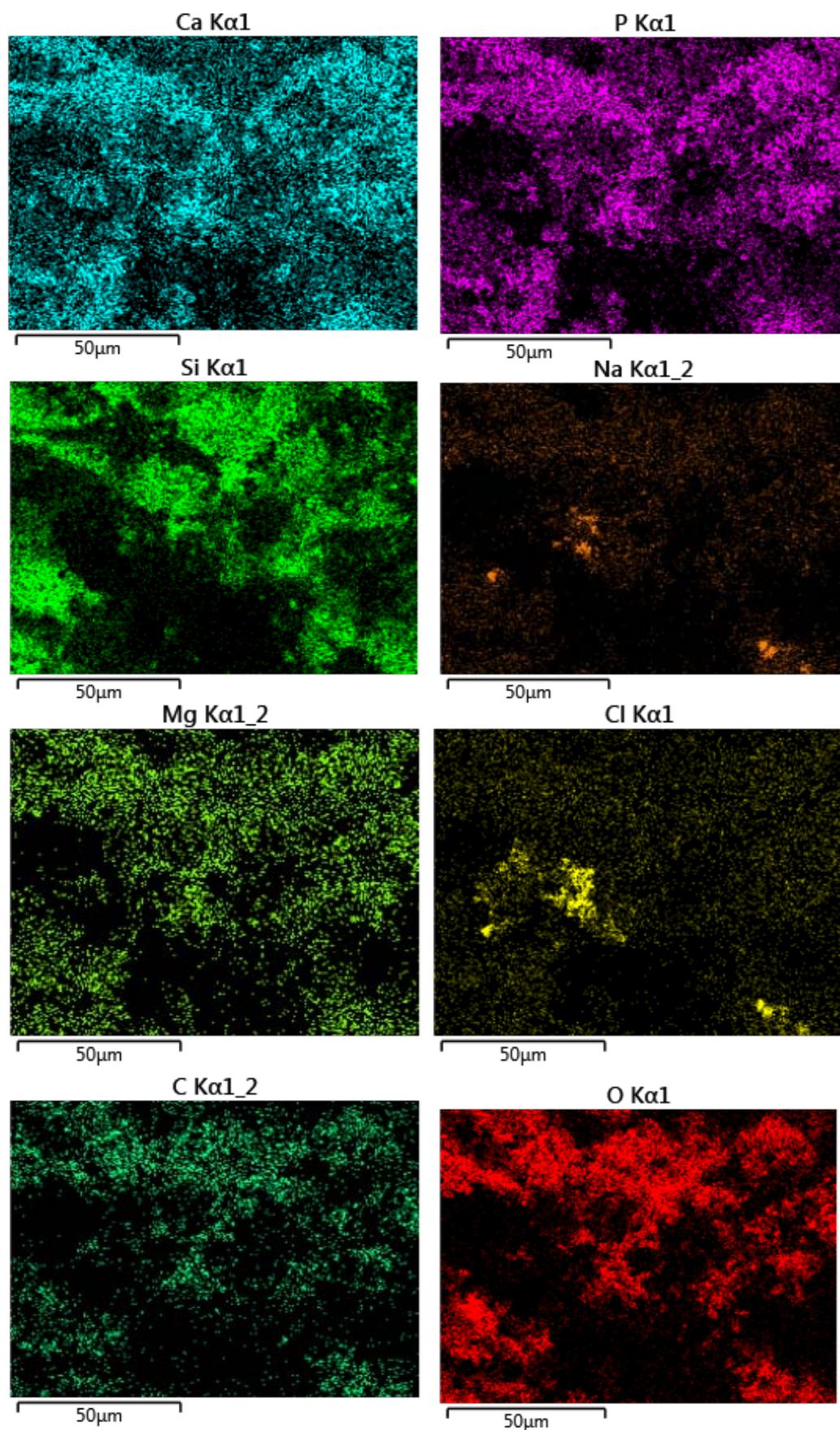
Con la finalidad de conocer el grado de homogeneidad, tanto del biovidrio experimental como de los cúmulos formados, se llevo a cabo un mapeo de los elementos presentes en la zona resaltada de la figura 16. En la figura 18 se pueden distinguir los elementos de interés por su color en la imagen, P en rosa, Ca en turquesa y Si en color verde. En esta imagen podemos observar la distribución de los elementos encontrados, donde la base de Si corresponde al biovidrio y los elementos superficiales, P y Ca, pueden verse ubicados en las zonas más altas de la muestra, lo que indica que el fosfato de calcio fue depositado a partir de núcleos de crecimiento presentes en el material base posterior a la prueba de bioactividad.

Fig 18. Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B22 4S



Adicionalmente, con ayuda de un mapeo de elementos, fue posible identificar la distribución de cada elemento en el material. Podemos observar que si bien existen zonas donde se acentúa la presencia de algún elemento, no hay zonas de ausencia total. El Ca, P, Si y O muestran distribuciones similares, lo que permite establecer que el crecimiento de hidroxiapatita se da en la superficie total del biovidrio. Sin embargo, la presencia de Mg y Cl es indicativo de la presencia de restos de SBF, asociada al proceso de lavado del material.

Fig 19. Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de microscopia SEM del biovidrio B22 4S.



A partir de cáscara de arroz proveniente de la arrocería Covadonga se sintetizó la muestra B29, mientras que con la cáscara de la arrocería San José se sintetizó la muestra B31, utilizando el mismo método de síntesis que la muestra B22 (Tabla 9). De las imágenes obtenidas se pudo observar la presencia de cavidades tridimensionales de formas irregulares y de diferentes tamaños en ambas muestras. Manifestándose el efecto de la procedencia de la cáscara de arroz en las características de su superficie; una superficie con cavidades pequeñas y en forma de laminillas para la muestra B29 (Figura 20), mientras que para la muestra B31 se puede observar una superficie con pliegues (Figura 22).

Posteriormente, las muestras obtenidas fueron inmersas en SBF con la finalidad de determinar su bioactividad en base al crecimiento de hidroxiapatita en su superficie. Por SEM se pudo observar que ambas muestras presentaron crecimiento de cúmulos en su superficie caracterizados por una estructura filamentosa (Figura 21 y 23).

Fig 20. Imagen SEM del biovidrio B29 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x.

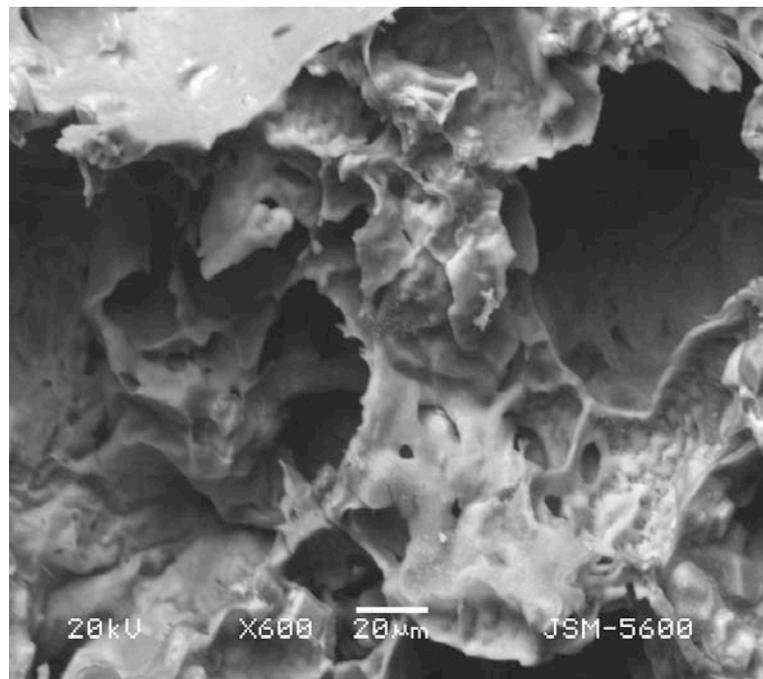


Fig 21. Imagen SEM del biovidrio B29 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x.

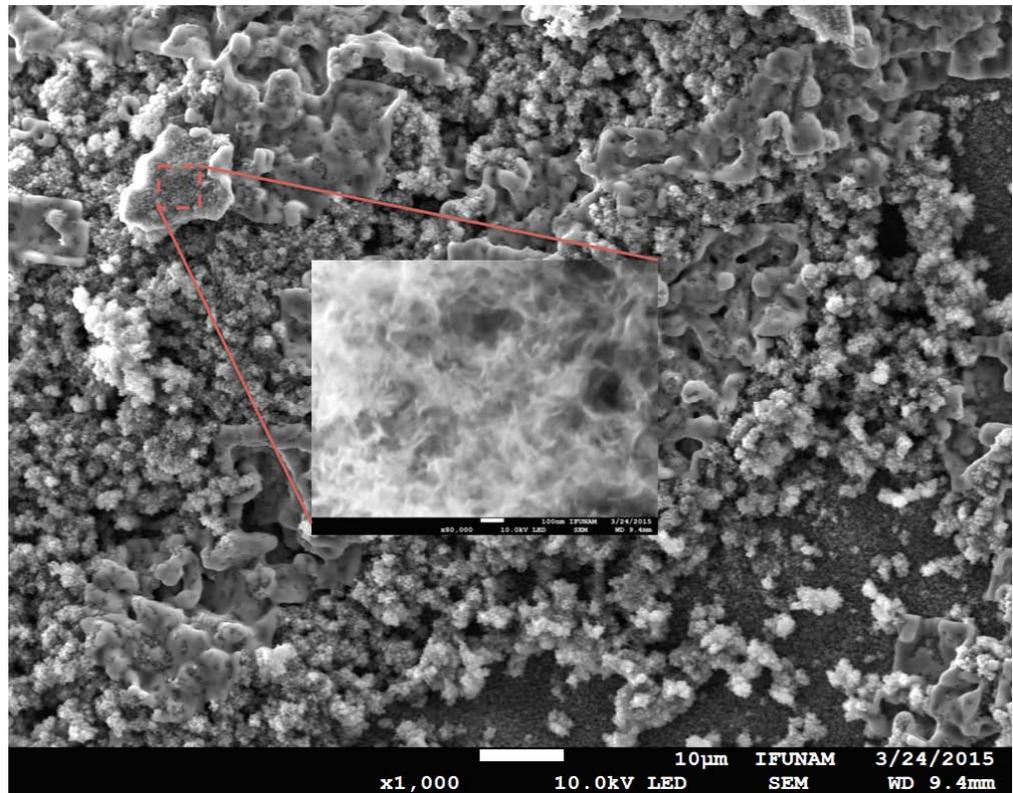


Fig 22. Imagen SEM del biovidrio B31 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x.

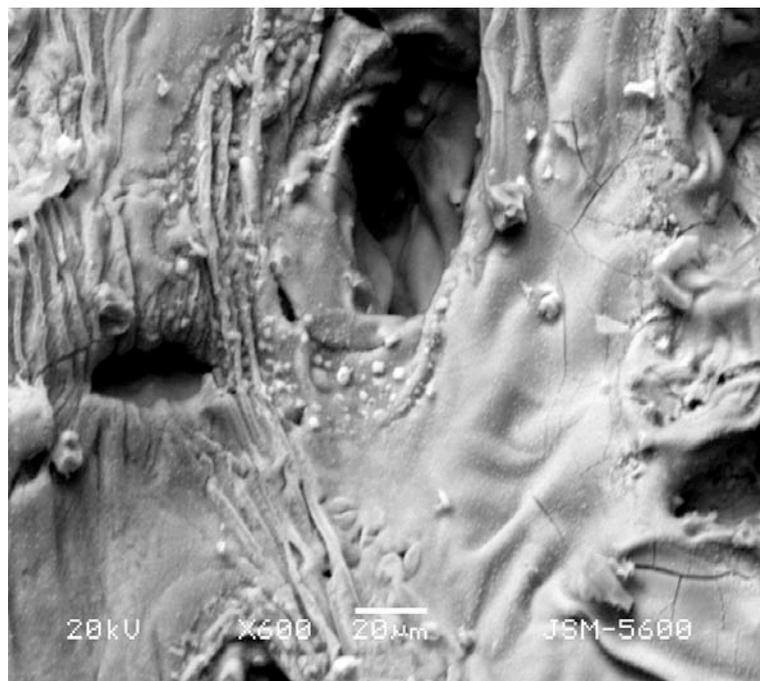
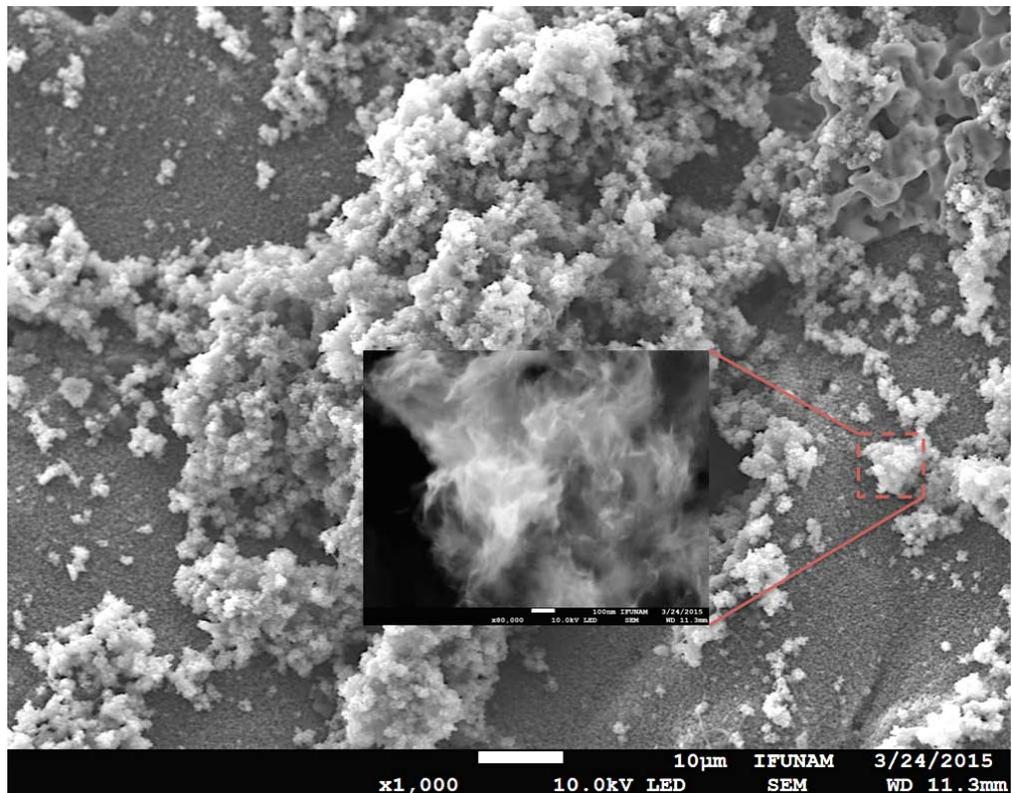


Fig 23. Imagen SEM del biovidrio B31 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x



Analizando los cúmulos formados en las muestras, sección resaltada en las figuras 21 y 23, se lleva a cabo un análisis elemental por EDS (Figura 24 y 25). Teniendo que para la muestra B29 se tiene una alta concentración de Cl, indicativo de solución SBF residual en la muestra. Mientras que la diferencia en el contenido de Si es un indicativo de la distancia entre la superficie y el cúmulo, a mayor contenido de Si más cerca de la superficie del biovidrio. Para la muestra B29 tenemos un contenido de Si menor, lo que sugiere que el cúmulo formado se encuentra más alejado de la superficie que el cúmulo observado en la muestra B31. A partir de los resultados obtenidos se calcula la proporción atómica Ca/P, teniendo que para la muestra B29 resulta de 1.63, mientras que para la muestra B31 es de 1.64, valores correspondientes a la formación de fosfatos de calcio.

Fig 24. Elementos presentes en la muestra del biovidrio B29 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS.

Elemento	Wt%	Atomic %
C	17.34	30.36
O	23.17	30.46
Na	10.92	9.99
Mg	0.99	0.85
Si	3.65	2.74
P	8.02	5.45
Cl	18.97	11.26
Ca	16.94	8.89
Total:	100.00	100.00

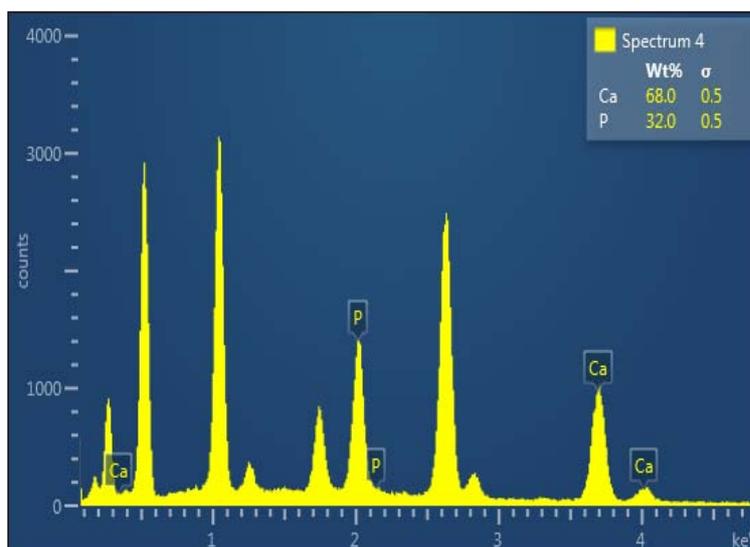
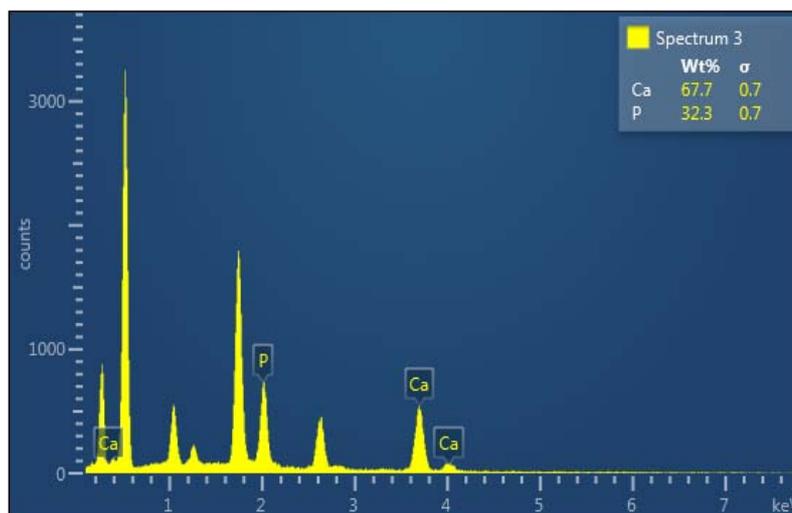


Fig 25. Elementos presentes en la muestra del biovidrio B31 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS.

Element	Wt%	Atomic %
C	21.85	33.66
O	37.20	43.02
Na	2.79	2.25
Mg	0.81	0.62
Si	9.82	6.47
P	6.99	4.18
Cl	5.64	2.94
Ca	14.90	6.88
Total:	100.00	100.00



A partir del mapeo de elementos por SEM, se tiene para la muestra B29 (Figura 26) la distribución de los elementos encontrados, P en amarillo y Ca en rosa. En esta imagen pueden verse distribuidos, tanto el P como el Ca, en toda la muestra indicando la presencia de fosfatos de calcio en los inicios de su cristalización y de forma bastante uniforme. Otro de los elementos que pueden verse ubicados superficialmente es el Cl, color verde, mostrando los restos de la SBF.

El siguiente conjunto de imágenes nos muestran el filtrado de los elementos en la imagen anterior (Figura 27). Podemos observar que si bien existen zonas donde se acentúa la presencia de algún elemento, no hay zonas de ausencia total. Son distribuciones similares las del Ca y P. El Si muestra claramente los límites del material base prácticamente en los que no hay material precipitado o el grosor de la capa es menor. También es notoria y muy delimitada presencia de Na y Cl que podrían indicar restos de la SBF que no se lavaron completamente, sin que se impidiera observar el crecimiento de apatita.

Fig 26. Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B29 4S.

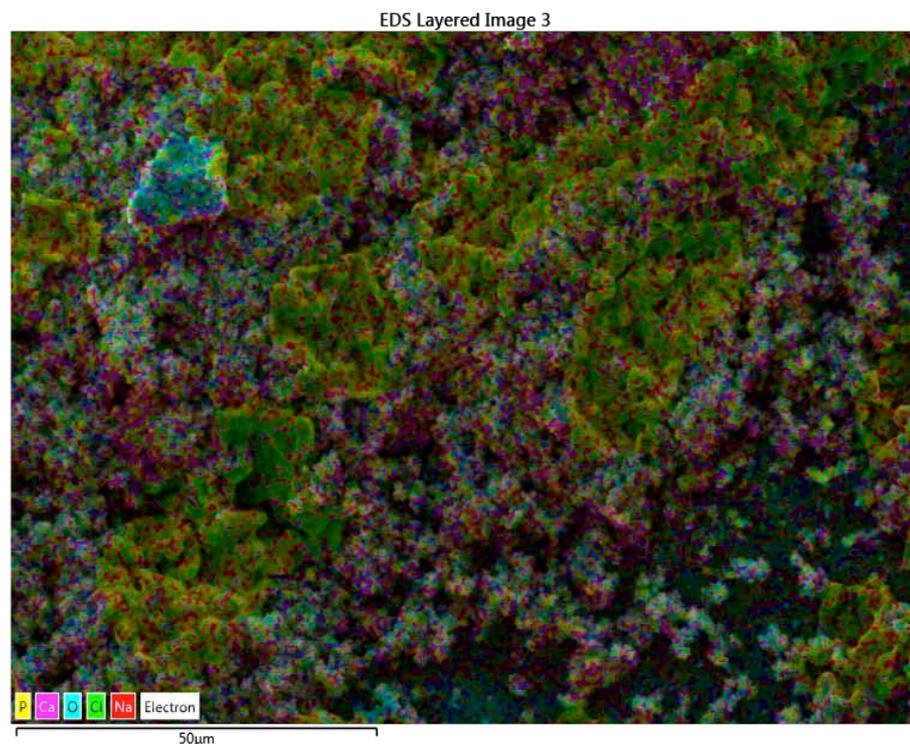
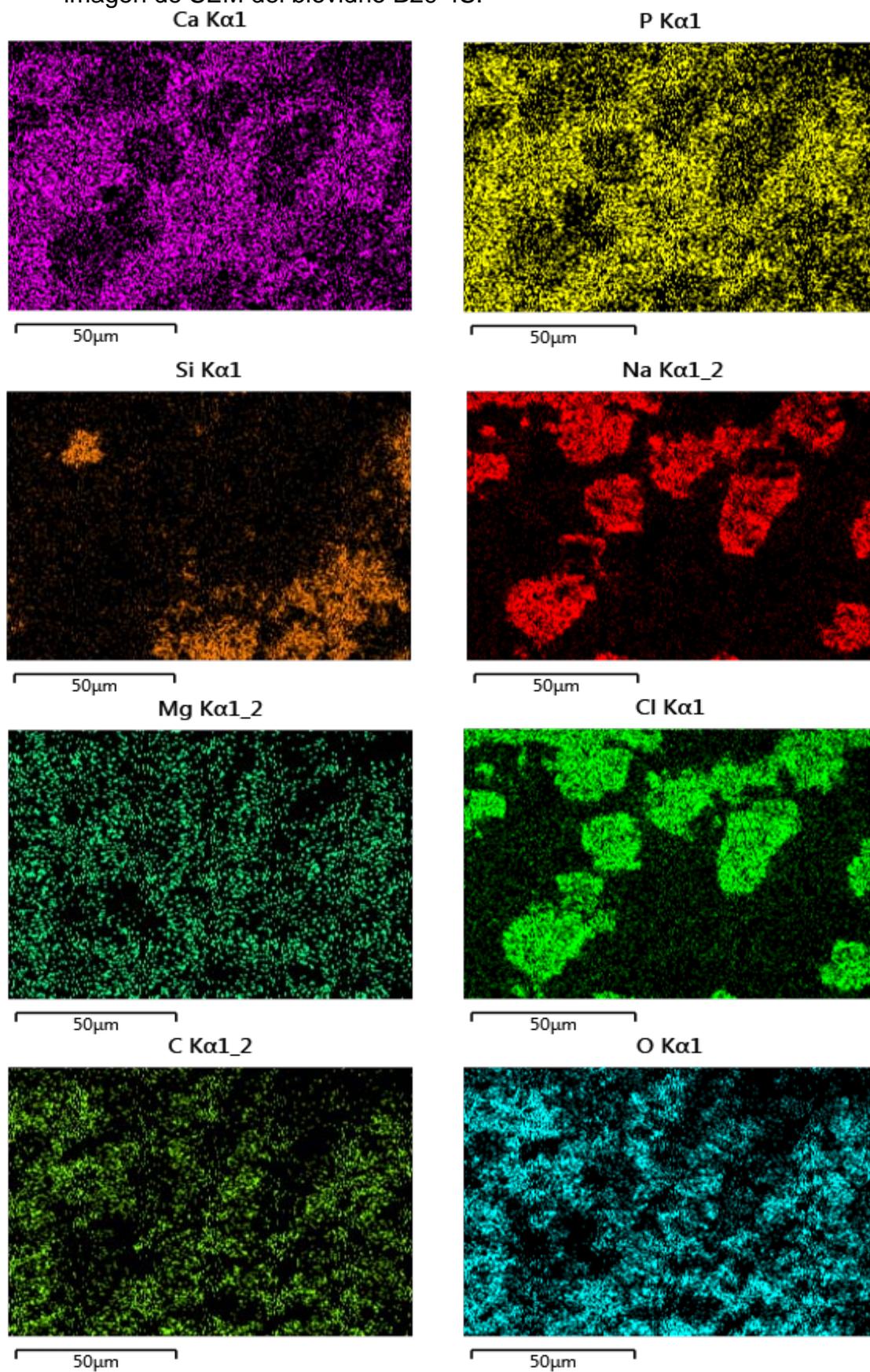


Fig 27. Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen en imagen de SEM del biovidrio B29 4S.



Mientras que el mapeo de elementos de la muestra B31 nos muestra la distribución de la base de Si, en color verde, que corresponde al biovidrio y los elementos superficiales P en turquesa y Ca en naranja ubicados en las zonas más altas de la muestra. Lo cual corrobora que, el P y el Ca, fueron depositados a partir de núcleos de crecimiento presentes en el material base. Puede observarse una pequeña mancha localizada de color rosa, correspondiente al Cl, que como se ha mencionado corresponde a los restos de la SBF (Figura 28).

Por el filtrado de la figura 28 tenemos imágenes que nos muestran la distribución de los elementos. Como en las muestras anteriores, existen zonas donde se acentúa la presencia de algún elemento sin manifestarse zonas vacías. Se muestra la distribución uniforme del Ca y P en proporciones similares. El Si muestra claramente los límites del material base prácticamente en los que no hay material precipitado o el grosor de la capa es menor. Se observa también la presencia de Cl asociada a la presencia del NaCl residual de la solución SBF. Con estas imágenes se hace notoria la composición y distribución del material en la superficie. Se puede ubicar en que zona se encuentran los núcleos de formación de apatita y otras zonas donde la cristalización comienza (Figura 29).

Fig 28. Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B31 4S.

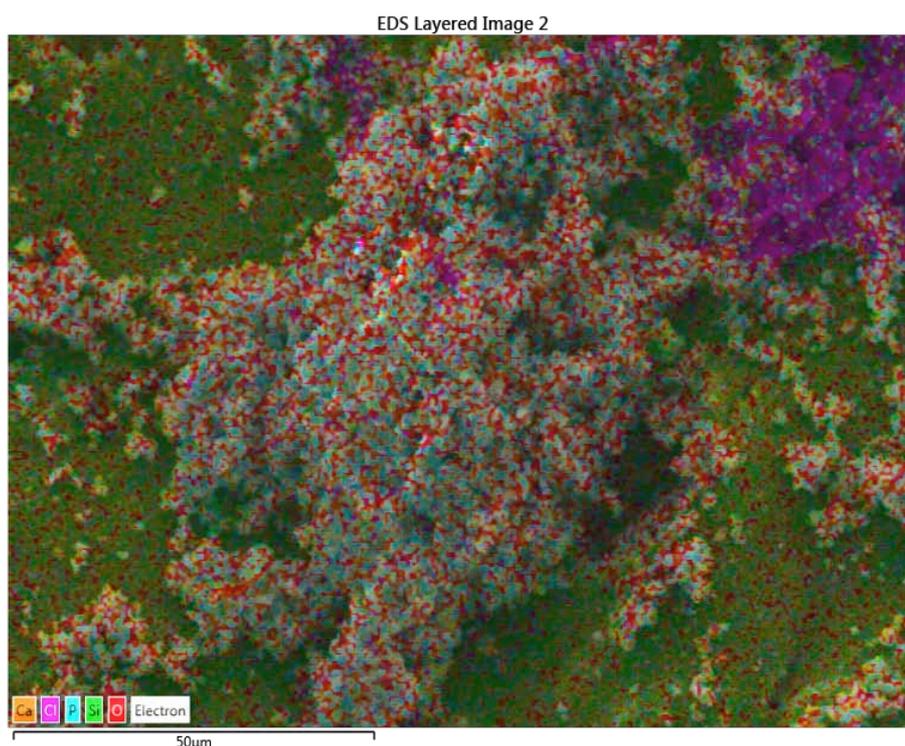
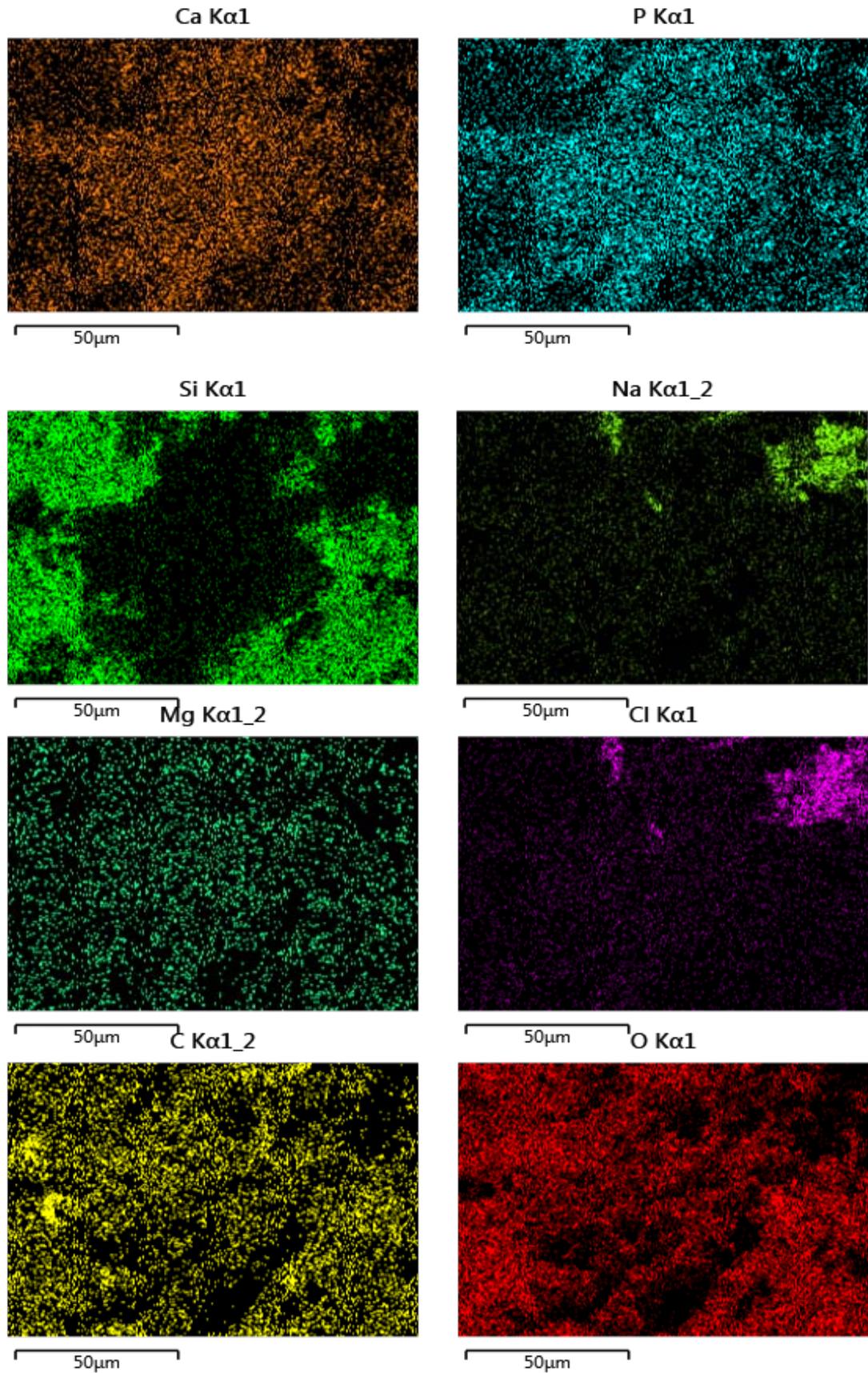


Fig 29. Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM del biovidrio B31 4S.



Formación de andamios 3D

Área superficial y porosidad

Continuando con el análisis de las muestras que favorecieron la formación de HAp, de las muestras del mismo lote, se procedió a realizar un estudio de sus propiedades de superficie a partir de la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno (Tabla 13). Las muestras sintetizadas con surfactante (B15 y B16) muestran áreas superficiales mayores, con un marcado efecto en el diámetro de poro, lo que demuestra el efecto de la presencia del surfactante.

Tabla 13. Tabla de propiedades de superficie de los materiales obtenidos por la técnica área BET.

Muestra	Área superficial BET (m ² /g)	Volumen de poro BJH desorción (cc/g)	Diámetro de poro BJH desorción (Å)
B15	16.230	0.1683	303.80
B16	11.810	0.0927	170.80
B22	6.257	0.0637	38.20
B27	6.077	0.0621	16.74

Porosidad por Microscopía óptica

Se analizó la estructura macroscópica de los biovidrios, siendo ésta una estructura porosa tridimensional. En las fotografías tomadas con microscopio óptico puede verse la profundidad de los poros en escala macroscópica por medio de la técnica de campo claro y oscuro, observándose la comunicación entre los poros longitudinal y transversalmente. En la técnica de campo claro (Fig. 30), el contraste de color indica el espesor en cada parte de la muestra y las trabéculas de la estructura formada. Se observan poros irregulares en forma y tamaño, comunicados entre si y algunos que salen de lado a lado de la muestra. Mientras que con campo oscuro (Fig. 31) se pudo confirmar la heterogeneidad de su superficie por las diferentes tonalidades de gris.

Fig 30. Imagen de microscopia óptica del biovidrio B22 obtenida a 10x en campo claro.

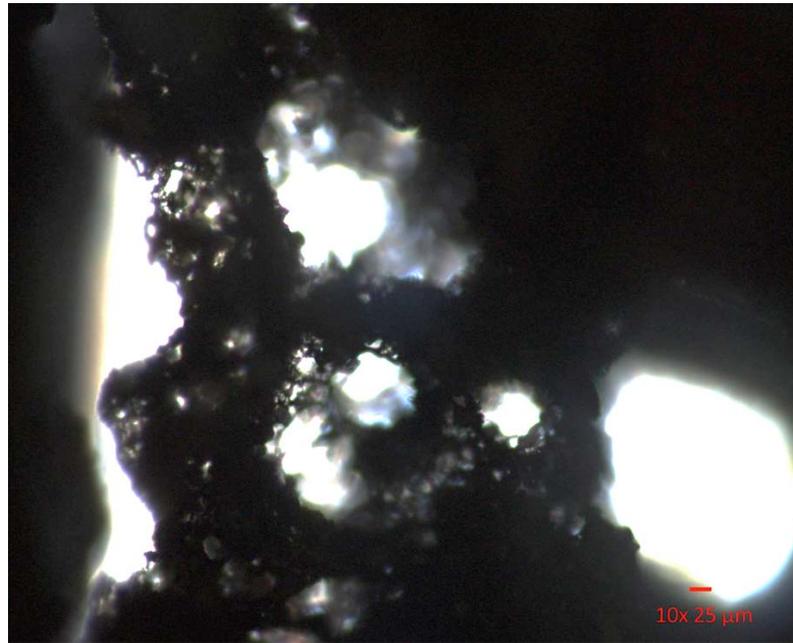
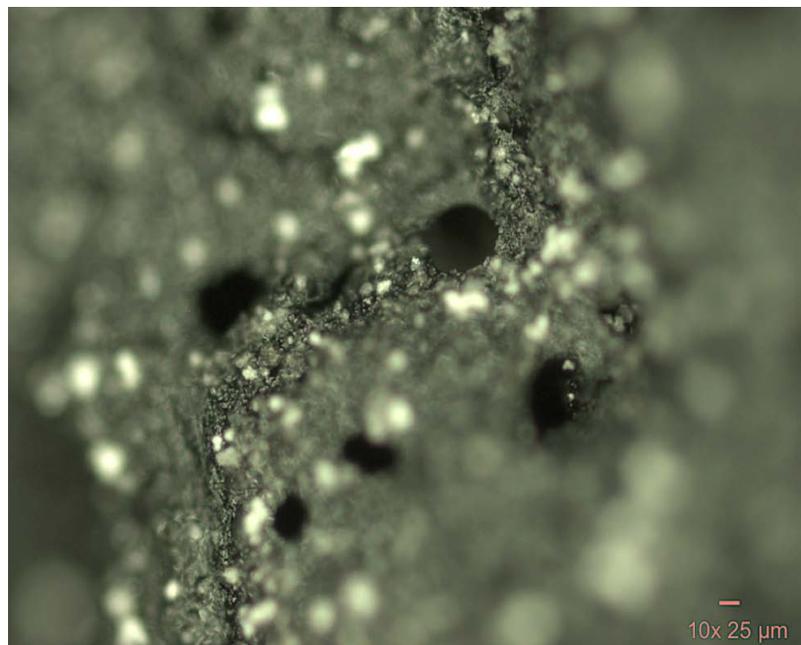


Fig 31. Imagen de microscopia óptica del biovidrio B22 obtenida a 10x en campo oscuro.

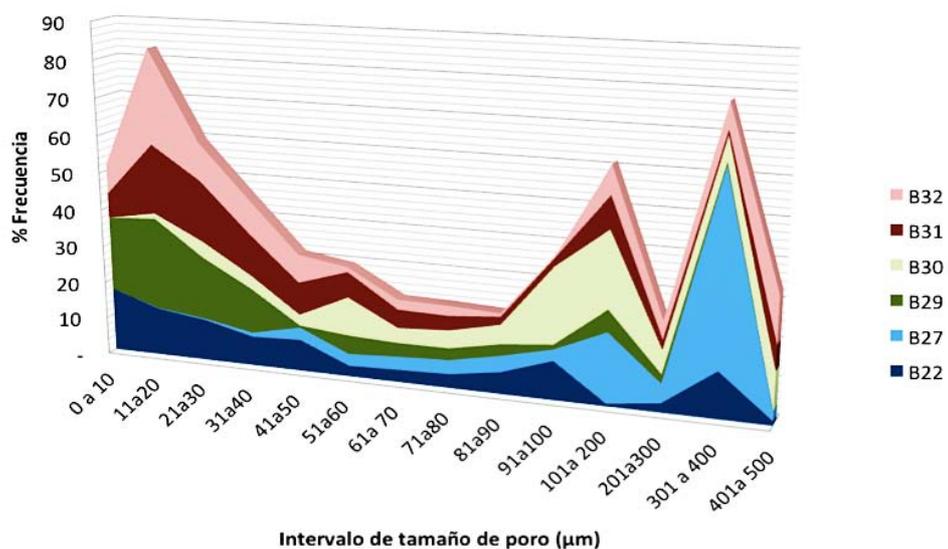


Porosidad por Microscopía electrónica (SEM)

Las micrografías por SEM de las muestras obtenidas muestran la presencia de andamios macroporosos con una arquitectura 3D trabecular. La presencia de estos andamios con varios tamaños es observada en las fotografías de las figuras 15, 20 y 22. Para obtener el tamaño aproximado de los andamios, diferentes regiones de las muestras fueron analizadas con SEM. Las muestras B15 y B16 mostraron una baja macroporosidad y no fueron consideradas en este análisis.

En los biovidrios experimentales la distribución de tamaño de poro se pudo observar con mayor frecuencia alrededor de varios tamaños muy notorios, con base a 7 a 10 micrografías tomadas de cada muestra. En orden ascendente el primer intervalo notorio es alrededor de 20 μm , la presencia de éste es común para las muestras B29 a B32. El segundo intervalo se encuentra cercano a 200 μm siendo común a todos los grupos, excepto el B22 en el que se encuentra recorrido ligeramente a 100 μm . Y el tercer intervalo común en todos los grupos, alrededor de 400 μm . Existe un intervalo que presenta una frecuencia menor y se ubica cerca de las 60 μm , presente en las muestras B30-B32. Mientras que en la muestra B29 está ausente y en las muestras B22 y B27 se recorre al intervalo inmediato inferior (50 μm). (Gráfica 1)

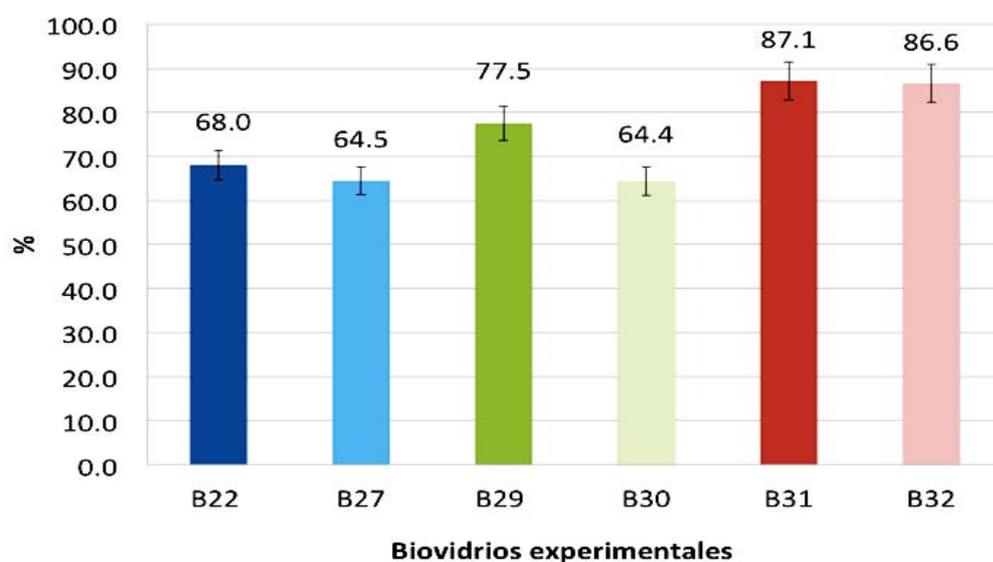
Gráfica 1. Distribución de la frecuencia de tamaño de poro de los materiales experimentales.



Porosidad total por Principio de Arquímedes

El porcentaje de porosidad total determinado para los materiales experimentales corresponde a los reportados en la gráfica 2. En esta se puede observar el efecto que tiene el origen de la cáscara de arroz, una porosidad mayor para las muestras sintetizadas del lote de la arrocera San José (muestras B31 y B32) en comparación con las otras cuatro muestras provenientes de la arrocera Covadonga. Mientras que la variación entre las muestras sintetizadas de la misma cáscara de arroz, arrocera Covadonga, muestran una ligera diferencia de porosidad.

Gráfica 2. Porcentaje de porosidad total de los materiales experimentales.



Análisis de los resultados

Tomando como material control el biovidrio comercial PerioGlas® Novabone (Biovidrio 45S5), se llevaron a cabo diferentes ensayos de síntesis con la finalidad de obtener una composición similar a la del material control con un método de síntesis totalmente novedoso.

El método de síntesis establecido se basa en el uso de ceniza de cáscara de arroz como fuente de sílice (con un contenido de sílice del 96%, calcio del 0.75%, sodio del 0.3% y fósforo del 0.4% e impurezas propias del material) adicionando como reactivos complementarios reactivos de sodio, calcio y fósforo de alta pureza. El método sol-gel utilizado tiene como principio la depolimerización de la sílice de cáscara de arroz en glicerol, previamente reportado.

Diferentes ensayos de síntesis se llevaron a cabo con la finalidad de encontrar los parámetros experimentales que permitieron la obtención de un material con la composición deseada. El método de síntesis se modificó acorde a los siguientes parámetros: temperatura y orden de incorporación de cada uno de los reactivos utilizados, tiempo de depolimerización de la sílice, proceso de eliminación de glicerol y temperatura de calcinado. Quedando claro el proceso de obtención del material buscado.

Los biovidrios obtenidos mostraron bioactividad, y se tuvo en ellos apatita superficial al sumergirlos en SBF, mientras que los materiales sintetizados sin sodio y los que tenían una composición superior al 60% de sílice, no favorecieron la formación de la capa de apatita en el material, lo que fue indicativo de que no presentaban bioactividad.

Con el fin de establecer el efecto de la composición de la cáscara de arroz se sintetizaron las muestras B29-B32 a partir de una cáscara de arroz diferente, acorde a los métodos establecidos para la síntesis de las muestras B22 y B27, resultando que la composición de la cáscara no afecta las características del biovidrio obtenido.

Cabe recalcar que a diferencia de los polvos obtenidos a partir de otros métodos de síntesis, este método permite obtener un material sólido con una estructura porosa tridimensional a simple vista además de una macro- y micro-porosidad intrínseca.

Conclusiones

- ✓ Con base a los resultados obtenidos se pudo observar que la síntesis de un biovidrio a partir de cáscara de arroz, material rico en sílice, es factible.
- ✓ Independientemente del origen de la cáscara de arroz se pudo establecer un método totalmente novedoso que permite la formación de vidrios bioactivos.
- ✓ La formación de apatita en la superficie de los biovidrios sintetizados, posterior a la prueba *in vitro* de inmersión de los materiales en solución fisiológica simulada, fue la pauta para establecer su bioactividad.
- ✓ Las pruebas realizadas permitieron establecer los parámetros experimentales necesarios para obtener un material con una composición similar a la de un biovidrio comercial.
- ✓ Las condiciones experimentales establecidas como idóneas se basan en un proceso de depolimerizado de la ceniza de cáscara de arroz a 200°C, con una incorporación posterior de los reactivos de calcio, sodio y fósforo, y calcinación del producto a 700°C por 3 horas.
- ✓ Bajo la metodología propuesta se lograron obtener andamios 3D en los biovidrios experimentales, lo que representa un gran avance en la optimización del proceso de obtención de sustitutos óseos.
- ✓ La inclusión de una técnica nueva, el uso de un material diferente como materia prima y la obtención de andamios de biovidrio, constituyen una innovación en biomateriales. Lo que permitió solicitar la patente del biovidrio experimental con el nombre “Cerámica bioactiva como sustituto óseo y método de obtención de la misma a partir de cenizas de cáscara de arroz” Folio MX/E2016/058814.

Perspectivas

Ésta investigación centro la atención en la formación de la capa de apatita pero se pudo observar la importancia de la modificación de parámetros experimentales para la formación de estructuras 3D por lo que se sugiere continuar investigándolos en relación a la estructura, **escalamiento y pruebas mecánicas** del material.

Al obtener la capa de apatita, se pueden continuar los estudios del material con **pruebas biológicas** in vitro o in vivo de acuerdo a la norma 10993 ISO ^{1,95} que permitan la utilización del material en seres vivos.

Los biovidrios se proyectan como materiales con una amplia gama de uso, por lo que la optimización del proceso con las pruebas necesarias contribuye favorablemente en el área de la salud, abriendo la brecha en una línea de investigación que seguramente derivará en más proyectos de investigación y formación de recursos humanos.

Anexos

Índice de tablas

Tabla 1.	Composición química de la ceniza de cáscara de arroz (RHA), obtenida mediante Fluorescencia de Rayos X.	40
Tabla 2.	Composición química de la ceniza de cáscara de arroz de los lotes RHA-C2 y RHA-SJ, obtenidos por medio de Fluorescencia de Rayos X.	41
Tabla 3.	Porcentajes referencia del contenido del biovidrio, cantidad en peso necesaria para la preparación de 1g de biovidrio.	42
Tabla 4.	Preparación de muestras por incorporación de los componentes en una sola etapa, primera serie de experimentos.	43
Tabla 5.	Efecto del orden de incorporación de reactivos y de la eliminación de glicerol en la preparación de muestras, segunda serie de experimentos.	44
Tabla 6.	Efecto de la temperatura de calcinación en la preparación de muestras, tercera serie de experimentos.	45
Tabla 7.	Preparación de muestras sin sodio.	45
Tabla 8.	Efecto de la presencia de surfactante y/o agitación con propela en la preparación de muestras.	46
Tabla 9.	Preparación de muestras a partir de diferentes lotes de cáscara de arroz, arrocería Covadonga (RHA-C2) y arrocería San José (RHA-SJ).	47
Tabla 10.	Composición química del material control obtenido por Fluorescencia de RX.	53
Tabla 11.	Composición química de los biovidrios experimentales obtenido por Fluorescencia de RX.	54
Tabla 12.	Comparación del Análisis químico de los biovidrios con el mismo método de síntesis y diferente fuente de ceniza, FRX	56
Tabla 13.	Tabla de propiedades de superficie de los materiales B22 y B27 obtenidos por la técnica área BET.	77

Índice de gráficas

- Gráfica 1.** Distribución de la frecuencia de tamaño de poro de los materiales experimentales. 79
- Gráfica 2.** Porcentaje de porosidad total de los materiales experimentales. 80

Índice de figuras.

Fig 1.	Representación gráfica del Sistema óseo.	12
Fig 2.	Representación gráfica de los usos de los materiales de sustitución ósea.	14
Fig 3.	Diagrama ternario del Bioglass.	17
Fig 4.	Representación gráfica del Método de Arquímedes.	39
Fig 5.	Caracterización de la ceniza de cáscara de arroz RHA, distribución de tamaño de poro (a) y partícula (b).	41
Fig 6.	Sistema de temperatura para la prueba de inmersión en SBF.	51
Fig 7.	Espectro Raman del material Perioglas de Novabone antes (PG) y después (PG 4S) de la prueba de inmersión.	53
Fig 8.	Patrón de difracción de RX de la muestra B22.	57
Fig 9.	Espectro Raman obtenido de la Hidroxiapatita de la marca Aldrich.	58
Fig 10.	Espectro Raman obtenido de la Calcita de la marca Aldrich.	59
Fig 11.	Espectro Raman comparativo de las muestras sintetizadas con la hidroxiapatita comercial.	60
Fig 12.	Espectro comparativo de diferentes zonas de la misma muestra B22.	61
Fig 13.	Imagen de HRTEM del biovidrio B27.	62
Fig 14.	Imagen indexada del biovidrio B27 correspondiente a la ficha ICDD 760694 hidróxifosfato de calcio (HAp).	63
Fig 15.	Imagen de SEM del biovidrio B22 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x.	65
Fig 16.	Imagen de SEM del biovidrio B22 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x.	65
Fig 17.	Elementos presentes en la muestra del biovidrio B22 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS.	66
Fig 18.	Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B22 4S.	67
Fig 19.	Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM del biovidrio B22 4S.	68
Fig 20.	Imagen de SEM del biovidrio B29 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x.	69

- Fig 21.** Imagen de SEM del biovidrio B29 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x. 70
- Fig 22.** Imagen de SEM del biovidrio B31 antes de la prueba de inmersión obtenida a 600x. 70
- Fig 23.** Imagen de SEM del biovidrio B31 4S después de 4 semanas en inmersión obtenida a 1000x y 80,000x. 71
- Fig 24.** Elementos presentes en la muestra del biovidrio B29 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS. 72
- Fig 25.** Elementos presentes en la muestra del biovidrio B31 4S después de 4 semanas en inmersión obtenido por análisis EDS. 72
- Fig 26.** Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B29 4S. 73
- Fig 27.** Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM del biovidrio B29 4S. 74
- Fig 28.** Superposición de los elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM B31 4S. 75
- Fig 29.** Elementos encontrados por mapeo de elementos en imagen de SEM del biovidrio B31 4S. 76
- Fig 30.** Imagen de microscopia óptica del biovidrio B22 obtenida a 10x en campo claro. 78
- Fig 31.** Imagen de microscopia óptica del biovidrio B22 obtenida a 10x en campo oscuro. 78

Índice de abreviaturas

SBF Simulated Body Fluid (Disolución fisiológica artificial)

SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

DRX Difracción de rayos X

FRX Fluorescencia de rayos X

EDS Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (Microanálisis de RX)

TEM Transmission Electron Microscopy (Microscopia electrónica de transmisión)

HRTEM High-Resolution Transmission Electron Microscopy (Microscopia de TEM de alta resolución)

SEM Scanning Electron Microscopy (Microscopia electrónica de barrido)

GPa Giga Pascales

HAp Hidroxiapatita

Tons Toneladas

RHA Rice Hull Ash (Ceniza de cáscara de arroz)

HCAp Hidroxiapatita carbonatada

Tg Temperatura de transición vítrea

Tc Temperatura de cristalización

Referencias

- ¹Shirtiliff VJ, Hench LL. Bioactive materials for tissue engineering regeneration and repair. *Journal of materials science* 2003; 38: 4697-4707.
- ²Hench L, Day D, Holand W. Glass and Medicine. *International Journal of Applied Glass Science* 2010; 1(1): 104-117.
- ³Spiekerman H. Atlas de Implantología. Barcelona, España: Editorial Másnon, 1995.
- ⁴Hench L. Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 1991; 74 (7): 1487-1510.
- ⁵Siqueira R, Dutra O. Gel- derived SiO₂-CaO- Na₂O-P₂O₅ bioactive powders: Synthesis and in vitro bioactivity. *Materials Science and Engineering C* 2011; 31: 983-991.
- ⁶Hench L, Splinter R J, Allen W C. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal Biomedical Materials Research* 1971; 2(1): 1117-141.
- ⁷Hench, L y cols. Patente Utilización de vidrio bioactivo, 2005. ES 2242851 T3.
- ⁸Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids *Acta Biomaterialia* 2013; 9: 4457-4486.
- ⁹Saboori A, Rabiee M, Mozlarzadeh F, Sheikhi M, Tahriri M, Karimi M. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass. *Materials Science and Engineering C* 2009; 29: 335-340.
- ¹⁰Wei J, Chen QZ, Stevens MM, Roether JA, Boccaccini AR. Biocompatibility and bioactivity of PDLLA/TiO₂ and PDLLA/TiO₂/Bioglass nanocomposites. *Materials science and engineering C* 2008; 28: 1-10.
- ¹¹Nayak J.P, Kumar S, Bera J. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2010; 356: 1447-1451.
- ¹²Sánchez FN, et.al. Mesoporous silica from rice hull ash. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2007; 82(7): 614- 619.
- ¹³Montufar EB, Maazouz Y, Ginebra MP. Relevance of the setting reaction to the injectability of tricalcium phosphate pastes. *Acta Biomaterialia* 2013; 9(4): 6188-98.
- ¹⁴Ali Alkhrisat M.H. Tesis doctoral. Bioactividad de cementos fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación en regeneración ósea. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Odontología. Madrid, 2008.
- ¹⁵Escamilla PA. Tesis Síntesis y caracterización de un biomaterial compuesto de hidroxiapatita y poliuretano como sustituto óseo. UNAM-CFATA. Juriquilla, Queretaro, 2011.
- ¹⁶Sequeda LG, Díaz JM, Gutiérrez SJ, Perdomo SJ. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 2012; 41(1): 50-66.
- ¹⁷Henríquez-Távora N, García-Molina JA, Greco-Machado Y, Carvalho-Lobato P, Belmonte-Calderón A, Serra-Renom I. Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en los tejidos calcificados de la mandíbula. *Biomecánica* 2002; 10(2): 5-13.
- ¹⁸Navarro VC. Cirugía Oral. Madrid: Ediciones Arán S.L.: 2008.
- ¹⁹Oporto VG, Fuentes FR, Alvarez CH, Borie EE. Recuperación de la morfología y fisiología maxilomandibular. *Biomateriales en regeneración ósea. International Journal of Morphology* 2008; 26(4): 853-859.
- ²⁰Monzón-Trujillo D, Martínez-Brito I, Rodríguez-Sarduy R, Piña-Rodríguez JJ, Pérez-Mír EA. Injertos óseos en implantología oral. *Revista Médica Electrónica [Internet].* 2014;36(4) Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202014/vol4%202014/te%20ma07.htm>
- ²¹Barrios de Arenas I, Vásquez M, Spadavecchia U, Camero S, González G. Estudio Comparativo de la Bioactividad de Diferentes Materiales Cerámicos Sumergidos en FSC. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2005; 25 (1): 23-30.
- ²²Hench LL. The story of Bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2006;17:967-978.
- ²³Sesman-bernal AL, León-pérez JA, Fernández-sobrino G. Actualidades en regeneración y remodelación ósea craneal. Revisión de la literatura. *Acta pediátrica de México* 2007; 28(5):183-92.
- ²⁴Silver I A, Deas J, Erecinska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001; 22: 175-185.
- ²⁵Cuñeyt Tas. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 373C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 2000; 21: 1429-1438.
- ²⁶ISO 23317. Implants for surgery: In vitro Evaluation for Apatite-forming Ability of implant Material. 2007.
- ²⁷Kokubo T, Takadama H, How useful is SBF In predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; 27: 2907-15.
- ²⁸Garrido L, Gil A, Gil A, Bueno L, Salinas S, Melgosa G, Vallet R. Bone defect healing by using a new bioactive glass. An experimental study in rabbits. *Revista Española de Cirugía Osteoarticular* 2002; 37 (211): 125-137.
- ²⁹Cortés DA, Medina A, Escobedo JC, Escobedo S, López MA. Uso de sistemas bioactivos en la formación de apatita en la superficie de aleaciones base Cobalto. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2004; 43 (5): 863-868.
- ³⁰Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial Effect of Nanometric Bioactive Glass 45S5. *Journal of Dental Research* 2007; 86: 754-757.
- ³¹ElBatal H.A, Azooz M.A, Khalil E.M.A, SoltanMonem A, Hamdy Y.M. Characterization of some Bioglass ceramics. *Materials Chemistry and Physics* 2003; 80: 599-609.
- ³²Loty C, et.al. Bioactive Glass Stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001; 16 (2): 231-239.
- ³³Kasuga T, Sawada M, Nogami M, Abe Y. Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses. *Biomaterials* 1999; 20: 1415-1420.
- ³⁴Jurczyk M.U, Jurczyk K, Miklaszewski A, Jurczyk M. Nanostructured titanium-45S5 Bioglass scaffold composites for medical applications. *Materials and Design* 2011; 32: 4882-4889.

- ³⁵Khorami M, Hesaraki S, Behnamghader A, Nazarian H, Shahrabi S. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. *Materials Science and Engineering C* 2011; 31: 1584–1592.
- ³⁶Rivera TF. Tesis doctoral. Estudio de nuevos compuestos acrílicos para uso dental. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química. México, 2011.
- ³⁷Nayak JP, Kumar S, Bera J. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2010; 356: 1447–1451.
- ³⁸Hafezi-Ardakani M, Mozlarzadeh F, Rabiee M, Reza-Talebi A. Synthesis and characterization of nanocrystalline merwinite ($\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$) via sol-gel method. *Ceramics International* 2011; 37: 175–180.
- ³⁹Mercier C, et al. Influence of P_2O_5 content on the structure of $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ bioglasses by ^{29}Si and ^{31}P MAS-NMR. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2011; 357(24): 3901-3909.
- ⁴⁰Qian J, Kang Y, Zilin W, Zhang W. Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane. *Materials Science and Engineering C* 2009; 29: 1361–1364.
- ⁴¹Ciro E, Zapata N, López E. Elaboración de un cemento óseo de fosfato de calcio con una adición de biovidrio. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2015; 54: 84–92.
- ⁴²Correa R, Monsalve M, López ME, Bolívar F, Vargas F, Ríos T, Muñoz A. Influencia de los parámetros de deposición en la porosidad y adherencia de recubrimientos de biovidrios del sistema $31\text{SiO}_2\text{-}11\text{P}_2\text{O}_5\text{-}51\text{CaO}\text{-}7\text{MgO}$ elaborados mediante proyección térmica por combustión oxiacetilénica. XI Congreso Iberoamericano de Metales IBEROMET & CONAMET/SAM 2010 http://iberomet2010.260mb.com/pdfcongreso/t4/T4-38_monsalve-m%20n2.pdf
- ⁴³Shen S, Cai S, Xu G, Li Y, Zhang T, Zhang M. Bond strength and corrosion resistance of bioglass coated magnesium alloy fabricated by uniaxial pressing and microwave hybrid heating. *Materials and Design* 2015; 86: 610–615.
- ⁴⁴Rabiee SM, NedaNazparvar, MisaqAzizian, DaryooshVashae, LobatTayebi. Effect of ion substitution on Properties of bioactive glasses: A review. *Ceramics International* 2015; 41: 7241–7251.
- ⁴⁵Montazerian M, Schneider JF, Yekta BE, Marghussian VK, Rodrigues AM, Zanotto ED. Sol-gel synthesis, structure, sintering and properties of bioactive an dinertnano-apatite-zirconia glass-ceramics. *Ceramics International* 2015; 41: 11024–11045.
- ⁴⁶Pourhaghgouy M, Zamanian A, Shahrezaee M, Pourbaghi M. Physicochemical properties and bioactivity of freeze-cast chitosan nanocomposite scaffolds reinforced with bioactive glass. *Materials Science and Engineering C* 2016; 58:180–186.
- ⁴⁷Kovtun A, Goeckelmann MJ. In vivo performance of novel soybean/gelatin-based bioactive and injectable hydroxyapatite foams *Acta Biomaterialia* 2015; 12: 242–249.
- ⁴⁸Hench L L. & Latorre G P. Reaction kinetics of bioactive ceramics. Part IV: effect of glass and solution Composition. In *biomat.5*, ed. T. Yamamuro, t. Koubo & t. Nakamura. Kobonshikankokai, inc., Kyoto, Japon, 1992, pp. 67774.
- ⁴⁹Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; 27: 2907–2915.
- ⁵⁰Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, Kokubo T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Research Bulletin* 2004; 17: 119–25.
- ⁵¹Cüneyt A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 2000; 21: 1429-1438.
- ⁵²Bohner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 2009; 30: 2175-2179.
- ⁵³Hoppe A, Guldal N, Boccaccini A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; 32: 2757-2774.
- ⁵⁴Nor Suhaida Shahabudin et al. Alumina (AF) Fabrication Optimization and SBF Immersion Studies for AF, Hydroxyapatite (HA) Coated AF (HACAF) and HA-Bentonite Coated AF (HABCAF) Bone Tissue Scaffolds. *Procedia Chemistry* 2016; 19; 884 – 890.
- ⁵⁵Qi S, Huang Y, Lin Q, Cheng H, Seo KJ. A bioactive $\text{Ca}_2\text{SiB}_2\text{O}_7$ ceramics and in vitro hydroxyapatite mineralization ability in SBF. *Ceramics International* 2015; 41; 12011–12019.
- ⁵⁶Nouri A, Castro R, Santos JL, Fernandes C, Rodrigues J, Tomás H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 434; 199-208.
- ⁵⁷Huang L, Zhou B, Wu H, Zheng L, Zhao J. Effect of apatite formation of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) on osteoblastogenesis using simulated body fluid (SBF) with or without bovine serum albumin (BSA) *Materials Science and Engineering C* 2016 Artículo en prensa MSC-06605; No de Paginas 7
- ⁵⁸Yucel S, Özçimen D, Terzioğlu P, Acar S, Yaman C. Preparation of Melt Derived 45S5 Bioactive Glass from Rice Hull Ash and Its Characterization. *Advanced Science Letters* 2013; 19(12): 3477–81.
- ⁵⁹Öchsner A, da Silva L, Altenbach H. Carcterization and development of biosystems and biomaterials. *Advanced Structured Materials*. Springer 2013; 29(13):33-54.
- ⁶⁰Ahumada LM, Rodríguez-Páez JE. Uso del SiO_2 obtenido de la cascarilla de arroz en la síntesis de silicatos de calcio. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 2006; 30: 581–94.
- ⁶¹Wu SC, Hsu HC, Hsiao SH, Ho WF. Preparation of porous 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds by using rice husk as a porogen additive. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009 ;20(6): 1229–36.
- ⁶²Wang X, Li Y, Lin J, Hodgson PD, Wen C. Effect of heat-treatment atmosphere on the bond strength of apatite layer on Ti substrate. *Dental Materials* 2008; 24(11): 1549–55.
- ⁶³Wei M, Uchida M, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of CaO-containing titania. *Biomaterials* 2002; 23(1): 167–72.
- ⁶⁴Bellucci D, Bolelli G, Cannillo V, Gadow R, Killinger A, Lusvardi L. High velocity suspension flame sprayed (HVSFS) potassium-based bioactive glass coatings with and without TiO_2 bond coat. *Surface and Coatings Technology* 2012; 206(19-20): 3857–68.
- ⁶⁵Chatzistavrou X, Kantiranis N, Kontonasaki E, Chrissafis K, Papadopoulou L, Koidis P, et al. Thermal analysis and in vitro bioactivity of bioactive glass–alumina composites. *Materials Characterization* 2011; 62(1): 118–29.
- ⁶⁶Jallot E, Benhayoune H, Kilian L, Irigaray J, Barbotteau Y, Balossier G, et al. Dissolution Kinetics, Selective Leaching, and Interfacial Reactions of a Bioglass Coating Enriched in Alumina. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001; 233(1): 83–90.

- ⁶⁷Zeng Y, Jiang D, Werner J, Greil P. Fabrication of Al₂O₃ – A / W bioglass bioactivity tapes by tape casting. *Materials Letters* 2002; 57:463–8.
- ⁶⁸Hamzawy EM, El-Meliogy EM. Crystallization in the Na₂O–CaO–Al₂O₃–SiO₂–(LiF) glass compositions. *Ceramics International* 2007; 33(2): 227–31.
- ⁶⁹Qi G, Zhang S, Khor K, Liu C, Zeng X, Weng W, et al. In vitro effect of magnesium inclusion in sol–gel derived apatite. *Thin Solid Films* 2008; 516(16): 5176–80.
- ⁷⁰Zheng K, Yang S, Wang J, Rüssel C, Liu C, Liang W. Characteristics and biocompatibility of Na₂O–K₂O–CaO–MgO–SrO–B₂O₃–P₂O₅ borophosphate glass fibers. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2012; 358(2): 387–91.
- ⁷¹Lázaro GS, Santos SC, Resende CX, Dos Santos EA. Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO₂·CaO·Na₂O·P₂O₅ bioglass system. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2014; 386: 19–28.
- ⁷²Sainz M, Pena P, Serena S, Caballero A. Influence of design on bioactivity of novel CaSiO₃-CaMg(SiO₃)₂ bioceramics: in vitro simulated body fluid test and thermodynamic simulation. *Acta Materialia* 2010; 6(7): 2797–807.
- ⁷³Watts SJ, Hill RG, O'Donnell MD, Law RV. Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2010; 356(9-10): 517–24.
- ⁷⁴Souza MT, Crovace MC, Schröder C, Eckert H, Peitl O, Zanotto ED. Effect of magnesium ion incorporation on the thermal stability, dissolution behavior and bioactivity in Bioglass-derived glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2013; 382: 57–65.
- ⁷⁵Monsalve M, Ageorges H, Lopez E, Vargas F, Bolívar F. Bioactivity and mechanical properties of plasma-sprayed coatings of bioglass powders. *Surface and Coatings Technology* 2013; 220: 60–6.
- ⁷⁶Varanasi VG, Saiz E, Loomer PM, Ancheta B, Uritani N, Ho SP. Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass (SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO-K₂O-Na₂O system) ions. *Acta Biomaterialia* 2009; 5(9): 3536–47.
- ⁷⁷Bracci B, Torricelli P, Panzavolta S, Boanini E, Giardino R, Bigi A. Effect of Mg⁽²⁺⁾, Sr⁽²⁺⁾, and Mn⁽²⁺⁾ on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2009; 103(12): 1666–74.
- ⁷⁸Manchon Miralles A. Síntesis y caracterización de Cerámicas de Fosfatos cálcicos sustituidas con iones de estroncio y hierro. Tesis Doctoral. Universidad Rey Juan Carlos Facultad de Odontología Departamento de Estomatología. Madrid 2011.
- ⁷⁹Ravarian R, Moztafzadeh F, SolatiHashjin M, Rabiee SM. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International* 2010; 36: 291–297.
- ⁸⁰Catauro M, Bollino F, Renella R.A, Papale . Sol–gel synthesis of SiO₂–CaO–P₂O₅ glasses: Influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility. *Ceramics International* 2015; 41:10(A): 12578–12588.
- ⁸¹Day RM, BoccacciniAR, Roether JA, HenchLL, Gabe SM. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25: 5857–5866.
- ⁸²Liu X, Ding C, Chu P. Mechanism of apatite formation on wollastonite coatings in simulated body fluids. *Biomaterials*. 2004; 25: 1755–1761.
- ⁸³Rey C, Combes C, Sfihi H, Barroug A. Physico-chemical properties of nanocrystallineapatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering C* 2007; 27: 198–205.
- ⁸⁴Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; 32: 2757-2774.
- ⁸⁵Ayatollahia MR, MohdYazidYahyab, AsgharzadehShirazia H, ShukurAbuHassanb. Mechanical and tribological properties of hydroxyapatite nanoparticles extracted from natural bovine bone and the bone cement developed by nano-sized bovine hydroxyapatite filler. *Ceramics International* 2015; 41: 10818–10827.
- ⁸⁶Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarene C. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2016; 432:15–30.
- ⁸⁷Marín M. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencias. Influencia del ZrO₂ y SiO₂ en las propiedades mecánicas de un ionómero vítreo experimental modificado con resina. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología. México 2011.
- ⁸⁸Pacheco-Malagón G, Pérez-Romo P, Sanchez-Flores N a., Guzmán-Castillo ML, López C, Saniger JM, et al. Local order in depolymerized silicate lattices. *Inorganic Chemistry*. 2005;44(23):8486–94.
- ⁸⁹De Barros Coelho M, Magalhães Pereira M. Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005; 75(2): 451–6.
- ⁹⁰Monchau F, Hivart P, Genestie B, Chai F, Descamps M, Hildebrand HF. Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity. *Materials Science and Engineering C* 2013; 33: 490-498.
- ⁹¹Ahmed R A, Fekry AM, Farghali RA. A study of calcium carbonate/multiwalled-carbon nanotubes/chitosan composite coatings on Ti–6Al–4V alloy for orthopedic implants. *Appl Surf Sci* 2013; 285: 309–16.
- ⁹²Kubisz L, Polomska M. FT NIR Raman studies on α -irradiated bone. *Spectrochimica Acta Part A* 2007; 66: 616–625.
- ⁹³Cuscó R., Guitián F., de Aza S. Artús L. Differentiation between Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate by means of μ -Raman Spectroscopy. *Journal of the European Ceramic Society*. 1998;18:1301-1305.
- ⁹⁴Selvaraju R, Raja A, Thirupathi G. FT-Raman spectral analysis of human urinary stones [SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy](#) 2012; 99:205–210.
- ⁹⁵International Standard ISO 10993 Biological evaluation of medical devices: 2007.