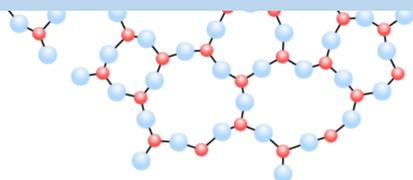


Obtención de biovidrios para aplicaciones como biomaterial



Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, Udelar

Laboratorio del Área Radioquímica - Departamento Estrella Campos - Facultad de Química, Udelar

Laboratório de Alto Impacto – CURE, Rocha

Laboratorio del Área Inmunología/Departamento de Biociencias - Facultad de Química, Instituto de Higiene, Udelar

Paola Sosa Basso

Tutor: Dr. Mauricio Rodríguez Chialanza¹

Montevideo, Uruguay

2022

A mi mejor compañía durante estos años,

la Negrita, Chicharito, Canela, Mona, Pocha, Pipo, y especialmente Tina...

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor el Dr. Mauricio Rodríguez, por compartir su conocimiento científico y ser mi guía durante el desarrollo de esta tesina.

A aquellas personas que colaboraron en el desarrollo del trabajo experimental: Heinkel Bentos Pereira del Departamento de Desarrollo Tecnológico del Centro Universitario Regional del Este (Cure), sede Rocha, por la obtención de los espectros XRD; José Fábian Schneider del Instituto de Física de la Universidad de São Paulo, en San Carlos, Brasil por las medidas de RMN en estado sólido; Ricardo Faccio del DETEMA de la Facultad de Química por la obtención de los espectros Raman y a Leopoldo Suescun del DETEMA de la Facultad de Química por la colaboración con la interpretación de los espectros XRD; y Gustavo Mourglia Ettlín del Laboratorio de Inmunología, Instituto de Higiene, por acompañarme durante el desarrollo de los ensayos de disolución.

A mis amigas, Victoria y Erika, con las cuales transcurrimos juntas los años de facultad, y a mi familia por su apoyo incondicional.

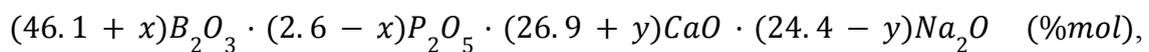
Tabla de contenido

Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1. Bioglasses.....	6
1.2. Vidrios fosfato y silicato.....	7
1.3. Boratos.....	12
1.3.1. Estructura.....	13
1.3.2. Método de preparación, <i>Melt – quenching</i>	16
1.3.3. Método de preparación, <i>Sol – gel</i>	16
1.3.4. Ensayos <i>in vitro</i>	18
1.3.5. Ensayos <i>in vivo</i>	19
1.3.6. Composiciones estudiadas.....	19
1.4. Propuesta y motivación.....	20
2. Materiales y métodos.....	21
2.1. Preparación de biocerámicos.....	21
2.2. Caracterización.....	22
2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	22
2.2.2. Espectroscopía Raman.....	24
2.2.3. Difracción de Rayos X (XRD).....	24
2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	25
2.2.5. Resonancia Magnética Nuclear (NMR).....	26
2.3. Ensayos <i>in vitro</i>	27
3. Resultados y discusión.....	30
3.1. Preparación de bioglass.....	30
3.2. Caracterización.....	31
3.3. Ensayos <i>in vitro</i>	38
4. Conclusión.....	42
Bibliografía.....	43
Anexo.....	47

Resumen

La capacidad de los vidrios bioactivos, o *biovidrios*, a base de borato de favorecer la formación de hidroxiapatita (HA) en ciertas condiciones, sus propiedades tales como biocompatibilidad, osteoinducción y osteoconducción, además de sus similitudes con la composición ósea, hacen que sean materiales prometedores para la regeneración ósea con aplicaciones en la biomedicina. Si bien se ha demostrado la capacidad de formación de HA en estos vidrios, estos han sido utilizando el Bioglass® “45S5” modificado con boro. No obstante, no existen suficientes reportes que permitan generar un modelo estructural que sea útil para predecir la capacidad de formación de HA de estos vidrios.

En este trabajo, con la intención de aportar información para la generación del modelo estructural, se estudió el sistema:



con $x = 0, +2, -2$ e $y = 0, +2, -2$. Para ello, se prepararon las muestras utilizando el método *Melt – quenching*. Los materiales obtenidos fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman, difracción de rayos X (XRD), resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC). De las muestras estudiadas, aquellas con composición $x = 0, y = 0$, y $x = 0, y = +2$ resultaron ser vítreas, mientras que las otras presentaron alguna fase cristalina. A los efectos de demostrar la capacidad de formación de HA se realizaron ensayos *in vitro* utilizando SBF (por su sigla en inglés *simulated body fluid*), considerado como método estándar para estos ensayos. Adicionalmente, se evaluó la bioactividad en K_2HPO_4 0.02 mol/L y un medio de cultivo celular. La caracterización estructural indicó que la incorporación de CaO al vidrio base produce alteraciones en la estructura de corto alcance, que a su vez se ve reflejado en la transición vítrea. Por otro lado, aunque fue posible determinar la bioactividad por ensayos en SBF, la disolución en un medio más complejo no es tan efectiva. El agregado de CaO disminuye la capacidad de formación de HA debido a un aumento en la conectividad de la red.

Palabras clave: *biomateriales, bioglass, boratos, bioactividad*

1. Introducción

1.1 Bioglasses

En las últimas décadas, los biomateriales han pasado a tener un gran desarrollo especialmente por su aplicación en el área de la medicina e ingeniería de tejidos. Estos, por definición, son aquellos materiales o superficies capaces de interactuar con sistemas biológicos, pueden ser naturales o sintetizados mediante polímeros, compuestos metálicos, cerámicos, etc., y son capaces de reemplazar, reparar o mejorar una función natural¹.

Por otro lado, la osteoporosis, artritis y otras patologías relacionadas a los huesos se han incrementado en los últimos años y también lo han hecho las intervenciones de trasplante de tejido óseo. Sin embargo, estos procedimientos tienen ciertos inconvenientes relacionados a la posibilidad de transmisión de enfermedades, respuestas autoinmunes, disponibilidad del tejido, etc. Como método alternativo para la regeneración ósea ha surgido la utilización de *scaffolds* de diferentes biomateriales. Un scaffold se caracteriza por tener una estructura porosa interconectada, una biodegradabilidad controlada, propiedades mecánicas similares al hueso, biocompatibilidad y tamaño de poros adecuado para permitir el crecimiento celular y el transporte de nutrientes. En este contexto, los bioglasses (o vidrios bioactivos) y sus respectivos vitrocerámicos son materiales inorgánicos prometedores en la producción de scaffolds para la regeneración ósea, esto es debido a sus propiedades tales como biocompatibilidad, osteoinducción y osteoconducción, además de sus similitudes con la composición ósea.²

El primer vidrio bioactivo, Bioactive Glass (BG) por su sigla en inglés, estudiado, también llamado 45S5 Bioglass®, fue desarrollado por Larry L. Hench en 1969³. Este bioglass es un vidrio cuya composición es de 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO y 6% P₂O₅ (% molar) capaz de reaccionar en condiciones fisiológicas, cuya bioactividad está determinada por la capacidad de unirse al tejido óseo mediante la formación de hidroxapatita (HA: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) en su superficie. Cuando es implantado, el bioglass se degrada lentamente y sus productos de disolución estimulan la diferenciación celular hacia células del tejido óseo (osteoblastos) en un proceso llamado osteoinducción. El BG se une al hueso existente y promueve el crecimiento de nuevo tejido óseo sobre su superficie, es decir, es osteoconductor.^{2,4}

1.2 Vidrios fosfato y silicato

Los vidrios presentan una constitución variada de arreglos estructurales con periodicidad de corto y mediano alcance que depende de su composición. Generalmente están compuestos por un formador de red (e.g. SiO_2 , P_2O_5 , B_2O_3) y otros componentes conocidos como *modificadores de red*, por ejemplo, óxidos alcalinos y alcalinotérreos (e.g. Na_2O , CaO). El agregado de estos últimos tiene un gran efecto en la estructura del vidrio tanto como en la polimerización de la red. Estos arreglos estructurales (tanto a corto como a mediano alcance) afectan directamente las propiedades del vidrio, es así que, entender dichas estructuras es un paso fundamental para predecir las características del mismo, tales como la solubilidad o la bioactividad.

La estructura de corto alcance en vidrios silicatos y fosfato consta de una unidad básica de un átomo de Si o P rodeado por cuatro átomos de O tetraédricos. En vidrios silicatos, los tetraedros de SiO_4 pueden estar conectados a otros tetraedros a través de sus cuatro esquinas (*Fig. 1.a*). Por otro lado, en vidrios fosfato, cada tetraedro de fosfato se conecta a un máximo de tres fosfatos tetraédricos (*Fig. 1.b*). Dichas uniones covalentes entre tetraedros, $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ en silicatos y enlaces $\equiv\text{P}-\text{O}-\text{P}\equiv$ en vidrios fosfatos, son llamados *bridging oxygen atoms* (bO) u oxígenos puentes en español. El número promedio de bO por átomo formador de red en un vidrio define la *conectividad de red*.⁵ La unión de varios de estos grupos estructurales forman agregados que definen la estructura de mediano alcance.

Si *modificadores de red*, tales como los mencionados anteriormente, son agregados a vidrios de fosfato o silicato, los bO se transforman en *non bridging oxygen atoms* (nbO) u oxígenos no puentes. Al aumentar las concentraciones de los modificadores de red en el vidrio, la cantidad promedio de nbO por átomo formador de red (Si o P) aumenta, resultando en una disminución del número de bO y de la conectividad de red, por lo tanto, en una red menos polimerizada.⁵

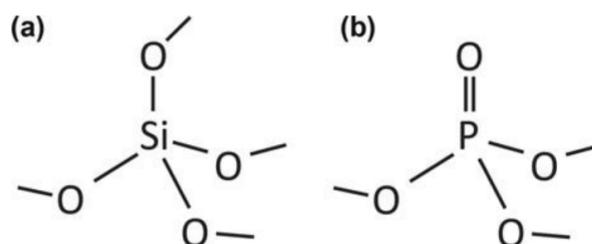


Figura 1: Unidades básicas de los vidrios silicato (a) y fosfato (b).⁵

En la sílice vítrea cada tetraedro de SiO_4 está unido a otro tetraedro SiO_4 en sus cuatro esquinas, lo que corresponde a cuatro bO por tetraedro. Al tetraedro con cuatro bO se le refiere como grupos Q^4 (la función Q^n corresponde a la cantidad de n oxígenos con los que está unido el catión mediante enlace). Tan pronto como se agrega algún óxido modificador a la sílice vítrea, los bO cambian a nbO, y aparecen grupos Q^3 . La cantidad relativa de estos aumenta mientras que la de Q^4 disminuye con el aumento de la concentración de óxido modificador, hasta que todos los grupos Q^4 se transforman en grupos Q^3 . Si la cantidad de los óxidos aumenta aún más, la cantidad relativa de Q^3 disminuye, mientras que simultáneamente, grupos Q^2 se empiezan a formar.

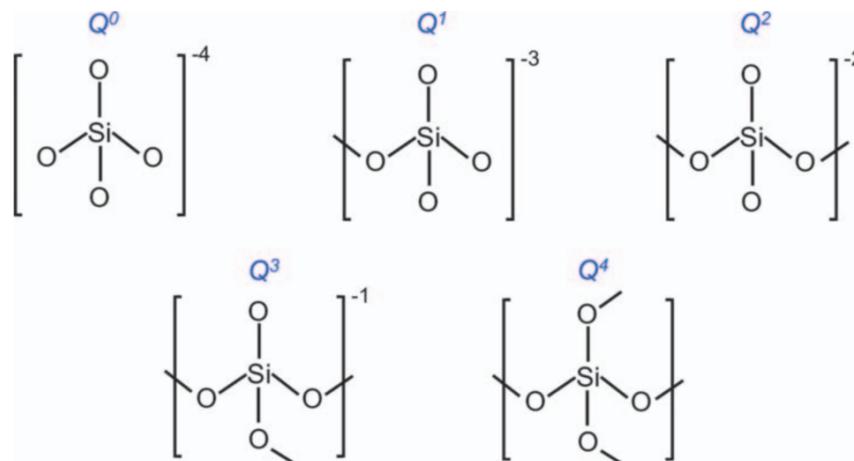


Figura 2: Especies tetraédricas de silicato, referidas como grupos Q^n , donde n denota el número de bO. ⁵

Para un bioglass la conectividad de red tiende a ser baja, con valores entre 2.0 y 2.6. Una conectividad de red de 2.0, que corresponde a un vidrio de metasilicato, consiste en cadenas o anillos de grupos Q^2 exclusivamente. Un aumento en la conectividad de red corresponde a una mayor polimerización, con un aumento en la cantidad de Q^3 , y subsecuentemente también un aumento en grupos Q^4 .

La conectividad de red tiene una gran influencia en muchas propiedades del vidrio, incluyendo su comportamiento térmico. La sílice vítrea presenta una conectividad de red de cuatro, lo que hace que tenga una alta temperatura de transición vítrea (T_g) (aprox. 1170 °C). A medida que se agregan óxidos modificadores, las temperaturas de fusión y transición vítrea disminuyen. Sin embargo, mientras la conectividad de red disminuye, el vidrio tiende a cristalizar más fácilmente, por ejemplo, al enfriarse luego de fundido. Esto significa que, con

la disminución de la conectividad de red, es más difícil obtener un estado amorfo típico del vidrio y es más difícil obtenerlo a temperaturas elevadas sin que cristalice.⁵

La sílice vítrea es químicamente muy estable a pH neutro o ácido, mientras que el vidrio se vuelve menos estable químicamente al agregar óxidos modificadores. En un pH ácido a levemente alcalino los vidrios que contienen óxidos modificadores se disuelven por un mecanismo de intercambio iónico: cationes como Ca^{2+} o Na^+ son liberados y reemplazados por protones del medio acuoso circundante en el vidrio. Esto resulta en un aumento de pH en el medio (debido a un exceso de iones OH^-). En soluciones que contienen iones fosfato (que simulan fluidos corporales, *body fluids, in vivo* tanto como medios de cultivo celular o *simulated body fluid (SBF) in vitro*), aún los bioglasses libres de fosfato pueden formar una superficie de HA, un proceso que se considera prerequisite para la bioactividad *in vivo* y la unión ósea.⁵

Se ha demostrado que una baja conectividad de red y un aumento en la cantidad de cationes modificadores en la composición del vidrio, conlleva a una mayor disolución y formación de HA *in vitro*.

La conectividad de red, por lo tanto, tiene una gran influencia en las propiedades del vidrio silicato, pero no es el único factor que contribuye. La relación carga-tamaño del catión modificador puede también afectar directamente las propiedades del vidrio. Los iones calcio (Ca^{2+}) y sodio (Na^+) tienen radios iónicos comparables, pero difieren en su carga. Los iones modificadores de mayor relación carga-tamaño forman puentes iónicos más efectivos entre los nbO. Como resultados, para vidrios con una conectividad de red constante, la temperatura de transición vítrea disminuye con el aumento de la relación $\text{Na}_2\text{O}/\text{CaO}$, mientras que su tendencia a la cristalización aumenta. Simultáneamente, el vidrio se vuelve químicamente menos estable.

En vidrios fosfato, estructuralmente hablando, la incorporación de óxidos modificadores de red es comparable al efecto en silicatos: los enlaces P–O–P se rompen y se forman nbOs. El P_2O_5 vítreo consiste en grupos Q_p^3 exclusivamente (*Fig. 3*). Esto hace que su conectividad de red sea de 3, lo que significa que se encuentra menos polimerizada que la sílice vítrea. La razón de esto es que el tetraedro PO_4 tiene un átomo de oxígeno terminal conectado al fósforo mediante un doble enlace, y así no se puede enlazar a otro tetraedro de fosfato. Al agregar óxidos modificadores, se forman grupos Q_p^2 y la cantidad relativa de las especies Q_p^3 disminuye.⁵

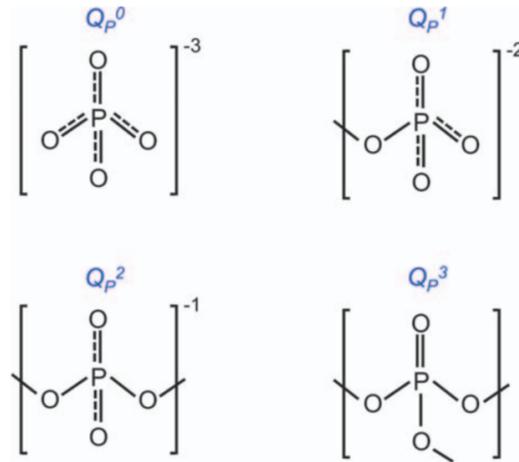


Figura 3: Especies tetraédricas de fosfato (Q_p^n) que pueden existir en vidrios fosfatos.

Las líneas punteadas corresponden a electrones deslocalizados. ⁵

En los grupos Q_p^2 el oxígeno terminal y el nbO son indistinguibles, ya que la carga negativa se encuentra deslocalizada sobre ambos átomos de oxígeno. Similarmente, en grupos Q_p^1 y Q_p^0 oxígenos no terminales (doble enlazados) pueden distinguirse. A diferencia de los vidrios silicato, los vidrios fosfato con una relación de óxidos modificadores: $P_2O_5 > 0.5$, pueden obtenerse en un estado amorfo y se ha demostrado que contienen grupos Q_p^1 y Q_p^0 . ⁵

El tetraedro de fosfato puede arreglarse para formar redes ramificadas, cadenas o anillos, y dependiendo de su relación O/P y la conectividad de red, los vidrios fosfato se pueden dividir en diferentes grupos: ultrafosfato, metafosfato y polifosfato. Los vidrios ultrafosfato tiene una relación O/P entre 2.5 y 3.1, y su estructura consiste en una red bidimensional de fosfato con una conectividad de red entre 2 y 3. Con el aumento de la cantidad de óxidos modificadores el número de nbO, y por lo tanto la relación O/P, aumenta. Un vidrio con relación O/P de 3, consiste grupos Q_p^2 únicamente, *i.e.* cadenas o anillos de largo infinito, correspondiente a una conectividad de red de 2.0. Estos vidrios son los llamados metafosfato.

Con el aumento de óxidos modificadores, *i.e.* aumento de la relación O/P, las cadenas se vuelven más cortas y la conectividad de red disminuye. Estos vidrios son los llamados polifosfato y contienen mayor cantidad de modificadores que fosfato. Por esta razón, a la

composición se la suele llamar vidrio invertido o *invert glasses*. Aquí, la estructura del vidrio no consiste más en una red, y los puentes iónicos entre nbO y cationes modificadores predominan en la determinación de las propiedades del vidrio frente a las uniones covalentes P–O–P. Debido a este aumento del carácter iónico en las uniones químicas en la estructura del vidrio, la T_g aumenta con el contenido del catión modificador.

El P_2O_5 vítreo es muy reactivo e higroscópico y el agregado de modificadores de red, como óxido de calcio, aumenta la durabilidad del vidrio. Esto es contrario a lo que ocurre en vidrios silicatos, donde la adición de óxidos modificadores disminuye la durabilidad. El motivo de esto es que los vidrios fosfato y silicato se degradan por mecanismos diferentes. Mientras que los vidrios silicatos al tener contacto con agua, liberan cationes por un proceso de intercambio iónico, dejando un gel con menor concentración de iones. Los vidrios fosfato, en contraste, disuelven la red de fosfato, esto incluye la hidratación de sus cadenas y la hidrólisis de P–O–P. Los grupos Q_p^3 (presente en P_2O_5 vítreo y vidrios ultrafosfato) son más susceptibles al ataque del agua y a la hidrólisis debido a los electrones π del doble enlace del oxígeno terminal no deslocalizados. La hidrólisis de P–O–P resulta en una disminución de pH del medio circundante, y esta disminución del pH se hace más pronunciada con el aumento de fosfato contenido en el vidrio. ⁵

Variaciones en el contenido de fosfato tienen también una gran influencia en el procedimiento de disolución. Para vidrios con un contenido de $P_2O_5 \leq 50$ mol%, la solubilidad disminuye con la reducción del contenido de fosfato. Vidrios con $P_2O_5 > 50$ mol%, muestran una tasa inicial de disolución más lenta, pero más tarde se disuelven aún más rápido que los vidrios polifosfato. La razón de esto es que para la disolución de ultrafosfatos, los enlaces P–O–P necesitan ser hidrolizados, mientras que en polifosfatos las cadenas pueden ser hidratadas y diluirse directamente (mientras que la hidrólisis P–O–P aún esté ocurriendo). La relación carga-tamaño de los modificadores también afecta la disolución, mostrando que una disminución en la solubilidad del vidrio es debida a un aumento en la relación CaO : Na₂O. Esto es debido a una mayor intensidad del campo del ion Ca²⁺, debido a su mayor carga y similar radio en comparación con el ion Na⁺. Con esta mayor carga, el Ca²⁺ se une al tetraedro de fosfato con un mayor número de coordinación a los fosfatos.

1.3 Boratos

Se ha demostrado que el contenido de elementos como el Magnesio, Estroncio, Zinc y Boro en los BGs tiene cierta influencia en la actividad de los osteoblastos y es capaz de estimular la angiogénesis. Especialmente los efectos del B han sido ampliamente reportados, mostrando un incremento en el metabolismo óseo, y en la liberación de factores de crecimiento y citoquinas.⁶

Una de las mayores diferencias entre los BG de silicato y de borato es el mecanismo y la cinética de reacción que poseen. Los BGs son capaces de formar una capa de fosfato de calcio cuando están inmersos en alguna solución que contenga fosfato, como el SBF. La reacción que ocurre en BGs de silicato es de la siguiente manera: una vez la superficie del vidrio se hidrata, este se empieza a disolver, y se forma una capa rica en sílice en la superficie del vidrio. La baja solubilidad de la sílice en estos tipos de fluidos es la razón de que se forme dicha capa. Los iones calcio del vidrio difunden por la capa de sílice y se unen químicamente al fosfato de la solución, formando una capa de fosfato de calcio amorfa. Posteriormente con el tiempo, el fosfato de calcio cristaliza en HA. La formación de HA es lo que permite que el tejido óseo se una al BG ^{6,7}. Los BGs de borato, a diferencia de los silicatos, forman HA directamente en la superficie del vidrio, sin la formación de una capa rica en borato. Esto es porque el borato es fácilmente soluble en SBF, similar a lo que ocurre en vidrios fosfatos. La falta de una capa de difusión permite a los BG de borato reaccionar por completo sin una reducción significativa en la cinética de disolución.⁷ Es así que, los BGs de borato, debido a su rápida degradación, y por ende más rápida reacción y subsecuente conversión a minerales óseos (HA), son considerados favorables en aplicaciones de ingeniería de tejidos.⁸ Sin embargo, resta encontrar un modelo estructural que permita predecir el comportamiento de estos sistemas.

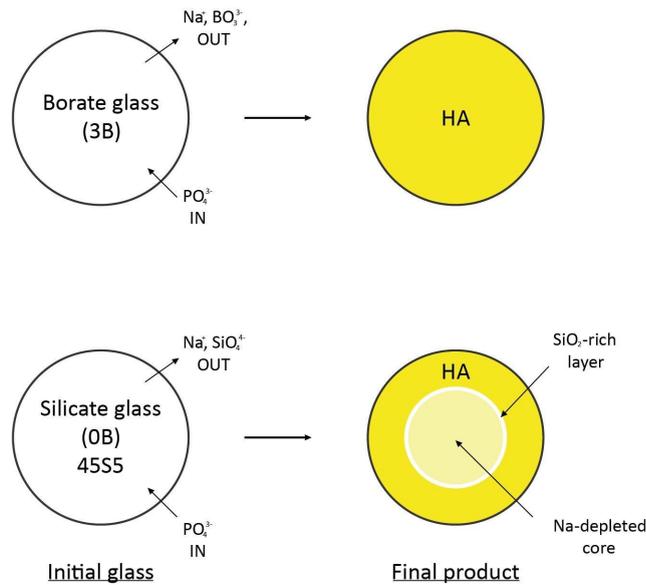


Figura 4: Diagrama esquemático de los mecanismos de conversión de BGs de borato (3B) y de silicato (45S5) en HA cuando se pone en contacto con una solución de fosfato.⁹

1.3.1. Estructura

El B_2O_3 vítreo consiste en grupos $B\emptyset_3$ trigonal planar (en este contexto, “ \emptyset ” denota para bO). La gran mayoría de los $B\emptyset_3$ trigonales, forman anillos boroxol de seis miembros ($3x B\emptyset_3$). Las unidades $B\emptyset_3$ trigonales, que conectan a estos anillos, son llamados, confusamente, $B\emptyset_3$ “aislados”, ya que se encuentran situados por fuera de las estructuras de los anillos.⁵

En contraste con los vidrios silicatos y fosfatos, la adición de óxidos modificadores (M_2O) no resulta en la formación de nbO en los grupos BO_3 . En cambio, esto aumenta la coordinación del boro desde una coordinación triple a una cuádruple, mientras que los $B\emptyset_3$ trigonales neutros se transforman en tetraedros con carga negativa $[B\emptyset_4]^-$, cuya carga es balanceada por el catión modificador M^+ . Esto significa que el grado de polimerización, *i.e.* la conectividad de red, aumenta con la incorporación de los modificadores. Estos tetraedros de borato pueden arreglarse en anillos borato, con uno o dos tetraedros $[B\emptyset_4]$ o incluso con unidades superestructuradas como el diborato (*Fig. 5*).⁵

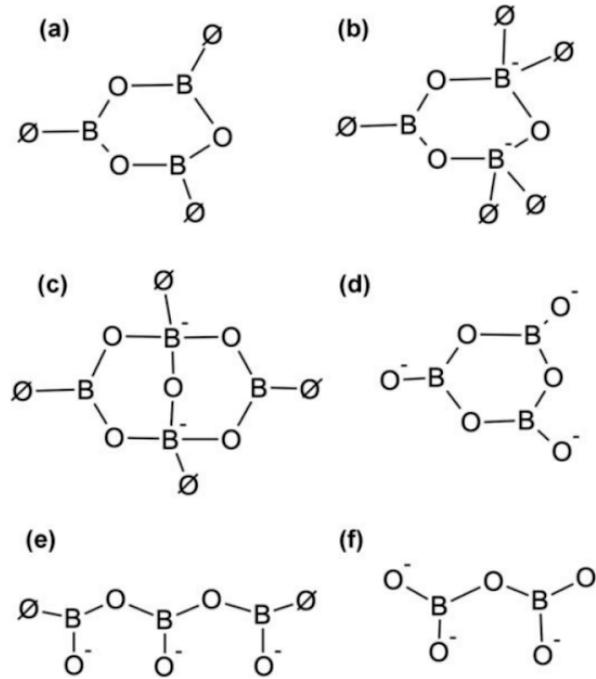


Figura 5: Superestructuras presentas en BGs de borato: (a) anillo boroxol, (b) anillo de borato, (c) grupo diborato, (d) anillo metaborato, (e) cadena de metaborato y (f) piroborato (Ø denota bO).⁵

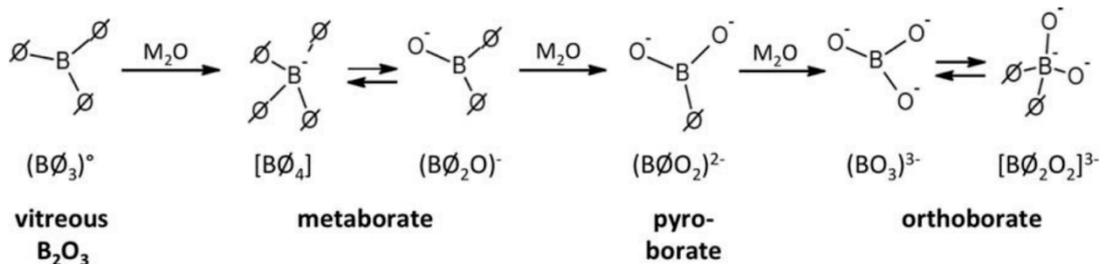


Figura 6: Cambios en el orden de corto alcance en BGs de borato con la adición de modificador (M₂O): la adición inicial de óxidos modificadores a B₂O₃ vítreo convierte grupos BØ₃ tetraédricos en unidades metaborato [BØ₄] tetraédricos. Existe un equilibrio entre metaboratos tetraédricos ([BØ₄]) y trigonales (BØ₂O). La adición de más modificador convierte los grupos metaboratos en piroboratos trigonales y, subsecuentemente, en ortoboratos. Los grupos BO₃³⁻ se podrán convertir en unidades [BØ₂O₂] tetraédricas.⁵

Para grandes agregados de óxidos, las unidades de tetraedro se vuelven a convertir en grupos boratos trigonales y la conectividad de red disminuye y la red se vuelve más despolimerizada a medida que el número de iones nbO incrementa. Aquí, los isómeros en forma de anillo y de cadena (Fig. 5 (d) y (e), respectivamente) o el borato trigonal, pueden ser

distinguidos, mientras que una despolarización mayor resulta en la presencia de dímero de piroborato (*Fig. 5 (f)*). Para ortoborato, se ha demostrado una segunda anomalía del boro, ya que los grupos BO_3^{3-} trigonales se pueden convertir en unidades tetraédricas $[\text{B}\emptyset_2\text{O}_2]^{3-}$ (*Fig. 6*), que se fusiona en anillos ortoborato de tres miembros $[\text{B}_3\text{O}_9]^{9-}$.⁵

El equilibrio entre los isómeros trigonales y tetraédricos depende del tipo de catión modificador que tiene un impacto significativo en el grado de polimerización y, subsecuentemente, en las propiedades del vidrio.

El grado de polimerización de una red de borato puede describirse como la fracción de boros tetraédricamente coordinados, N_4 .

$$N_4 = B_4 / (B_3 + B_4),$$

donde B_3 y B_4 denotan para boro tri- y tetra- coordinado, respectivamente.

Para contenidos de modificador menor al 33.3 mol%,

$$N_4 = R = M_2O / B_2O_3$$

Una forma de diferenciar entre boratos trigonales y tetraédricos, es mediante la utilización de la espectroscopía infrarroja ya que permite identificar los modos vibracionales de B—O en boratos trigonales y tetragonales (*Fig. 7*).⁵

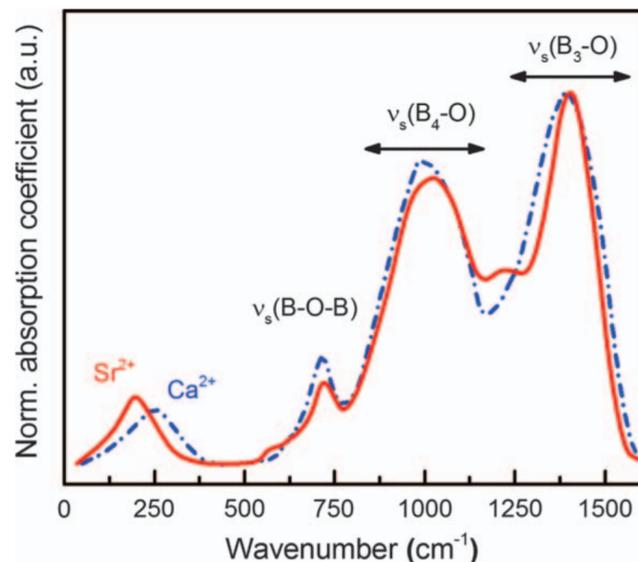


Figura 7: Espectro IR normalizado de BGs $55\text{B}_2\text{O}_3/45\text{MO}$ ($M= \text{Ca}$ o Sr) donde se observan los modos vibracionales de estiramiento de B—O de boratos trigonales (B_3 ; $800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) y tetraédricos (B_4 ; $1250\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), el modo bending de B—O—B cercano a 715 cm^{-1} , tanto como la banda del catión en el IR lejano.⁵

Los vidrios borato son solubles en agua, su solubilidad es afectada por la polimerización de la red de forma que la solubilidad disminuye con la incorporación inicial del óxido modificador, causado por el incremento de la cantidad de grupos $[B\text{O}_4]^- M^+$. Una vez el contenido de modificador aumenta en mayor proporción, la solubilidad aumenta debido a la despolimerización de la red de borato conteniendo grupos BO_3 .⁵

1.3.2. Método de preparación, *Melt – quenching*

El método más común de obtención de BGs es el melt quenching, que consta de la fusión (*i.e* melt) de óxidos de los componentes seguido de un rápido enfriamiento (*i.e* quenching). Los vidrios se preparan mezclando las fracciones en mol/masa de los ingredientes iniciales. Para tener una mezcla más homogénea se puede utilizar un molino de bolas. El polvo molido se transfiere a un crisol de alúmina o un crisol de platino para ser fundido en un horno. Los crisoles de alúmina pueden ser usados para aquellos vidrios que funden a bajas temperaturas y al usar sustancias que puedan interaccionar con el platino, a altas temperaturas la alúmina puede difundir fuera del crisol hacia el vidrio y modificar su composición. Las temperaturas de fusión de vidrios fosfato o boratos suelen ser entre 1200 y 1300 °C. El vidrio fundido, finalmente, se vierte en un molde precalentado o placa donde va a producirse el proceso de enfriamiento.¹⁰

1.3.3. Método de preparación, *Sol – gel*

Por otro lado, en las últimas tres décadas, el método de *sol-gel* ha revolucionado el área biomédica, permitiendo la creación de composiciones nuevas de alta pureza, nanopartículas uniformes, materiales porosos y mesoporosos que pueden ser utilizado en el transporte de drogas y medicamentos, por ejemplo. La mayoría de los BG que se obtienen por el método de melt-quenching involucra óxidos precursores, altas temperaturas de fusión y un rápido enfriamiento, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la técnica de sol-gel es un proceso que ocurre a bajas temperaturas, que puede crear áreas superficiales muy específicas (SSA: specific surface areas) y volumen de poro (PV) tanto como un amplio rango de composiciones. Esto se reportó inicialmente para vidrios silicatos obtenidos por *sol-gel* en 1991 por Li et al.. Demostraron que mejora ciertas propiedades del vidrio (*i.e.* área superficial y volumen de poro), expandía el rango composicional de los vidrios que se podría

convertir en HA (*i.e.* bioactividad) *in vitro*, que eran limitaciones en la técnica de melt-quenching.¹¹

En contraste con los sol-gels basados en silicato, donde el principal formador de red está coordinado tetraédricamente [SiO₄] lo que da como resultado una red fuertemente interconectada, en boratos el ion B se encuentra típicamente coordinado trigonalmente, dando a carácter pseudo-tridimensional, ya que la red BO₃ es más planar. Sin embargo, se sabe que, en la mayoría de los sistemas basados en borato, una fracción del boro puede encontrarse coordinado cuádruplemente [BO₄], lo que depende de la cantidad de metales alcalinos o alcalinotérreos presentes en la composición. No obstante, la combinación de tri- y cuadru-coordinaciones baja la conectividad de red, lo que reduce la durabilidad química y aumenta la tasa de disolución. Más importante aún, esto hace que la formación del gel sea difícil.¹²

En 2015, Lepry y Nazhat, crearon el primer *Bioactive Borate-Based Sol-Gel Glass* (SGBG) cuya composición sustituye con borato al 45S5¹² (46.1% B₂O₃, 26.9% CaO, 24.4% Na₂O y 2.6% P₂O₅, composición % molar). A partir de éste crearon un amplio rango de SGBGs con un contenido de 31-61 mol% de B₂O₃. Para el precursor de borato, mezclaron ácido bórico y etanol anhidro para formar trietil borato y etanol, al cual se le agregó metoxietóxido de calcio (20% en metoxietanol), metóxido de sodio (25% en metanol) y trietil fosfato (TEP). Todas las composiciones gelificaron dentro de los 10 días, dando como resultado vidrios amorfos luego calcinar a 400°C. Debido al proceso del sol-gel, estos vidrios se obtuvieron con un área superficial y porosidad al menos 2 órdenes de magnitud mayor que los equivalentes obtenidos por el método melt-quenching, lo que permite la formación de HA dentro de las 3hs; lo que representa una mejoría en la velocidad de conversión de 25 veces, comparado con vidrios melt-quenching.¹¹ Sin embargo, los estudios de disolución fueron realizados únicamente en SBF y con una solución de K₂HPO₄. Ambas técnicas han sido cuestionadas. En la *Fig. 8* se muestran las reacciones de hidrólisis y condensación durante el método sol-gel, estos son mecanismos de sustitución nucleofílica (S_N), que involucran el ataque nucleofílico de ligandos OR u OH del boro trigonal electrofílico con la eliminación de agua o alcohol. Por otro lado, en la *Fig. 9* esquematiza el proceso de sol-gel, durante este, el ácido bórico es disuelto en etanol, el cual crea un exceso de agua, permitiendo las reacciones de hidrólisis y policondensación y eventualmente haciendo que gelifiquen los componentes precursores.¹²

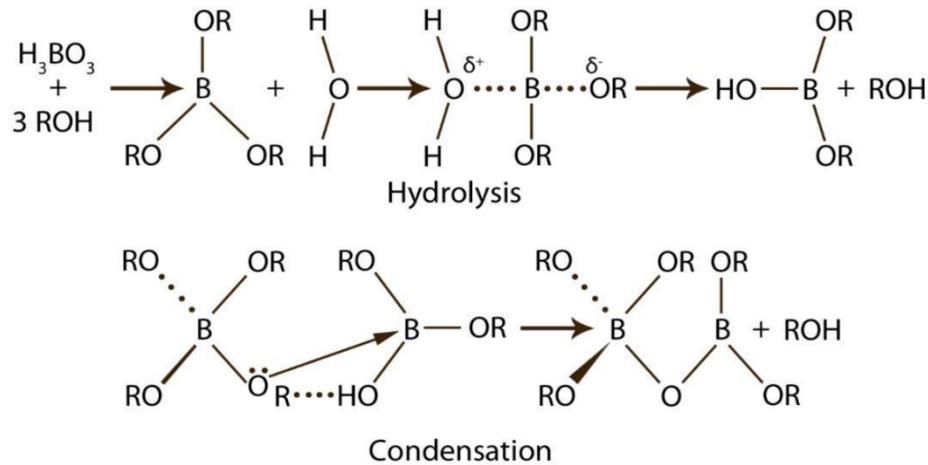


Figura 8: Ruta esquemática de la formación de red en boratos durante el proceso de sol-gel propuesto por Brinker et al. en 1990.^{12,13}

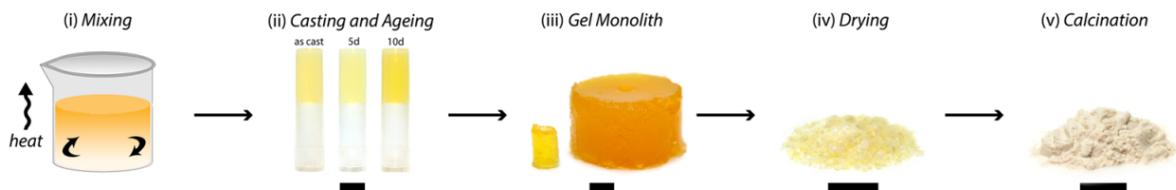


Figura 9: Proceso sol-gel; (i) mezcla de componentes precursores, (ii) fundido y envejecimiento, (iii) monolitos de gel en el día 10, (iv) secado, y (v) post calcinación a 400 °C (barra de escala =1 cm). (iii) Demuestra que se puede aumentar proporcionalmente la escala y producir en contenedores más grandes.¹²

1.3.4. Ensayos *in vitro*

Los BG, a base de silicio, han sido extensamente estudiados *in vitro*. Y tres son los fenómenos de interés que se buscan evaluar: (i) el aumento del pH en la solución en los alrededores del BG, (ii) la concentración de iones que es liberada por la disolución del vidrio y (iii) las capas de HA que se forman en la superficie del BG.¹⁴

El método más utilizado en la literatura y que ha sido reconocido por la International Standards Organization (ISO), es el testeo de dilución en SBF, el cual evalúa la habilidad de formar una capa de HA en la superficie del material cuando está sumergido en la solución. Esta metodología resulta ser menos laboriosa que los ensayos celulares, se necesita menos experiencia y resultan ser menos costosos. Sin embargo, hay varias controversias sobre este test, como cuán semejante es esta solución al fluido corporal (ya que es una solución acuosa,

cuyas concentraciones iónicas son similares a la del plasma sanguíneo) y qué tanto lo mimetiza.^{4,15}

La citotoxicidad y el comportamiento osteogénico también se ha evaluado *in vitro* pero utilizando varias líneas celulares. Las células osteogénicas, en la presencia de BG, o sus productos de disolución, muestran un aumento en la actividad metabólica y producen más matriz ósea y más nódulos óseos mineralizados que otros biocerámicos sin la adición de factores de crecimiento u hormonas. La capa de HA que se forma parece ser químicamente compatible con las células y responden diferencialmente a las concentraciones de los componentes del BG. También, se ha demostrado que los BG regulan positivamente los genes asociados con formación de hueso, incluyendo en gen *c-Myc* de respuesta sensible al crecimiento, reguladores del ciclo celular, reguladores de la apoptosis, receptores de superficie celular y reguladores de la matriz extracelular. Este efecto es dosis-dependiente. Esto es importante, ya que un exceso de iones aumentaría el pH de forma que puede causar daño en las células.⁴

1.3.5. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* en animales son necesarios como paso previo a la implantación de cualquier dispositivo médico en humanos. Para minimizar la cantidad de animales que son utilizados y para obtener resultados confiables, son necesarios modelos efectivos. El modelo animal que se ha definido para la investigación de biocerámicos en regeneración ósea fue determinado por Oonishi et al. utilizando el cóndilo femoral de conejo (el hueso de la pierna justo por encima de la rodilla).⁴

Una de las características importantes a tener en cuenta respecto a los BG es que, para que sean eficaces en la regeneración ósea, la resorción del implante no debe ocurrir antes de que el hueso tenga la oportunidad de regenerarse.⁴

1.3.6. Composiciones estudiadas

En la actualidad, diferentes estudios intentan buscar la composición óptima de los BGs de borato para así optimizar su funcionalidad. Entre ellos, Thind et al.¹⁶, sustituyeron la sílice por borato en wt% (porcentaje en peso) de la composición de diferentes BG de silicatos para evaluar su solubilidad en SBF. Estudiaron muestras que tenían 0, 2, 4 y 6 % wt de P₂O₅. Encontrando que, las muestras que contenían mayor cantidad de P₂O₅ (6 wt%) muestran una mayor pérdida de peso luego de las 270 hs de inmersión en SBF a 37°C. También, que la

liberación de iones Na, Ca y B, es máxima para las muestras que poseen 6% de P₂O₅ y mínima para aquellas que poseen 2%. Por lo que, la adición de fosfato disminuye la durabilidad. Pero se vio que pequeñas adiciones de P₂O₅ (2 wt%) a BG de boratos alkali-alkali, ayudan a aumentar la durabilidad química al compactar la estructura y disminuir la pérdida de peso.

En 2015, Abo-Naf et al.¹⁷, variaron las composiciones en borato de diferentes BGs de la siguiente manera: $x\text{B}_2\text{O}_3\text{-}15\text{Na}_2\text{O-}15\text{CaO-}(70\text{-}x)\text{P}_2\text{O}_5$ con $5 \leq x \leq 30$ mol%. Allí notaron que concentraciones de 25 y 30 mol% de B₂O₃ poseían una mejor bioactividad *in vitro* y 30 mol% B₂O₃ da la mayor pérdida de peso en SBF. También notaron que, a mayor cantidad de B₂O₃, el BG posee mejores propiedades mecánicas. Sin embargo, cabe destacar que como en este caso la concentración de P₂O₅ supera en gran medida la de B₂O₃, no sólo se forma una red de borato en el BG sino que también una de fosfato.

También, en 2015, Lepry y Nazhat¹², compararon las propiedades de la composición 45B5 (45S5 sustituido en borato) obtenido mediante la técnica *melt-quenching* y la misma composición y variantes de ésta pero obtenidos mediante *sol-gel*. De este estudio concluyeron que las muestras obtenidas por sol-gel poseen un área específica superficial de partícula al menos de dos órdenes mayor que las de melt-quenching, lo que se traduce en un dramático aumento en la interacción acuosa y liberación de iones. También, estas muestras son capaces de formar una capa de HA luego de inmersión en SBF de solamente 3 hs.

Lepry et al., en 2018¹⁸, analizaron las diferencias obtenidas de variar la composición 45B5 en la cantidad de NaO (0 - 24,4 mol%) en SGBGs sintetizados a partir de *sol-gel*, y concluyeron que el aumento en Na aumenta la reactividad pero no la bioactividad, también que esto supone una mayor pérdida de masa y degradabilidad *in vitro*, ya que hay mayor intercambio de iones.

1.4 Propuesta y motivación

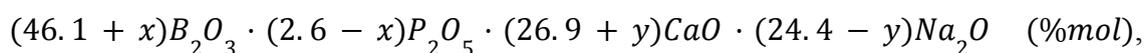
En base a la información presentada anteriormente, en este trabajo se propone partir de la composición 45B5 (correspondiente a la composición original propuesta por Hench, y en la que se sustituye el silicio de 45S5 por el boro)^{11,12,18}, y mediante un diseño experimental, estudiar el efecto de la variación de sus constituyentes en un 2%. Mediante esta variación se pretende analizar el efecto del formador de red y del modificador en las propiedades térmicas, su estructura y el efecto en el proceso de disolución.

2. Materiales y métodos

2.1 Preparación de biocerámicos

Se preparan las muestras a partir de los reactivos CaCO_3 , H_3BO_3 , Na_2CO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (calidad ACS) secados por cuatro horas a 80°C , según la masa correspondiente (Tabla 1), para una masa final de 10 g de vidrio de cada composición propuesta. Los reactivos se mezclan en molino de bolas a los efectos de lograr una mezcla homogénea. Estos se funden en un crisol de alúmina a temperaturas entre 1000 y 1300°C con agregados de a poco, y se cuela a 1300°C sobre molde de acero. Para ello se utiliza un horno eléctrico vertical Across Internacional, del Laboratorio del Área Radioquímica, DEC, Facultad de Química. Cabe aclarar que, aunque se mencionó en la sección 1.3.2, que a altas temperaturas la alúmina puede difundir fuera del crisol hacia el vidrio y modificar su composición, como en este caso la fuente de fosfato que se utiliza es un compuesto de amonio y este podría reaccionar con el platino del crisol, es que se utilizó alúmina.

Partiendo de la composición del Bioglass original de Hench³ modificado por boro, se propone analizar el efecto del formador (x) y del modificador de red (y) de acuerdo al siguiente esquema,



con $x = 0, +2$ y -2 e $y = 0, +2$ y -2 , lo que da un total de nueve muestras. En la *Tabla 1* se presentan las composiciones preparadas.

Tabla 1: Composición de los Bioglass preparados (%mol)

x, y	B_2O_3	CaO	Na_2O	P_2O_5
$x = 0, y = 0$	46.1	26.9	24.4	2.6
$x = 0, y = +2$	46.1	28.9	22.4	2.6
$x = 0, y = -2$	46.1	24.9	26.4	2.6
$x = -2, y = 0$	44.1	26.9	24.4	4.6
$x = -2, y = +2$	44.1	28.9	22.4	4.6
$x = -2, y = -2$	44.1	24.9	26.4	4.6
$x = +2, y = 0$	48.1	26.9	24.4	0.6
$x = +2, y = +2$	48.1	28.9	22.4	0.6
$x = +2, y = -2$	48.1	24.9	26.4	0.6

2.2 Caracterización

2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis cualitativo, tanto como cuantitativo, que se basa en la capacidad de las moléculas de absorber energía en la región infrarroja del espectro electromagnético (700 nm hasta 1 mm) y la vibración de sus átomos. El espectro infrarrojo de una muestra se obtiene cuando, al pasar radiación infrarroja a través de ella, una parte de la radiación incidente es absorbida por los átomos los cuales vibran con una energía particular. La señal que aparece como un pico en el espectro de absorción, corresponde a la vibración de una parte de alguna molécula de la muestra a determinado valor de energía. Para que una molécula sea activa en el infrarrojo debe sufrir un cambio en el dipolo eléctrico durante la vibración.

Los átomos en las moléculas se pueden mover uno respecto al otro, es decir, mediante sus enlaces, y generar vibraciones de estiramientos (*stretching*) o de torsiones (*bending*). Algunos enlaces pueden estirarse de forma simétrica (*symmetric bending*) o de forma asimétrica o fuera de fase (*asymmetric bending*).¹⁹

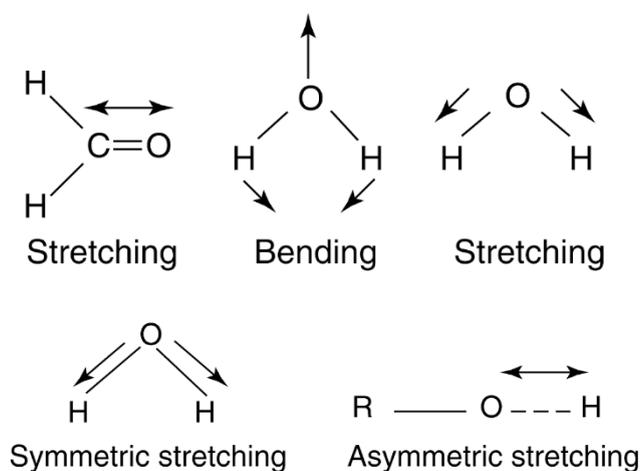


Figura 10: Esquemas de vibraciones *vending* y *stretching*.

Los instrumentos infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) detectan todas las longitudes de onda simultáneamente y utilizan un interferómetro para producir patrones de interferencia que contiene la información espectral infrarroja.²⁰ Los componentes básicos del espectrómetro de FTIR se muestran en la *Fig. 11*.

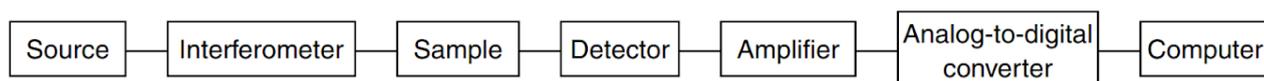


Figura 11: *Composición básica de un espectrómetro FTIR.*²⁰

Para este caso, se utilizó la técnica de espectroscopía FTIR en modo de reflectancia total atenuada (ATR) la cual utiliza el fenómeno de reflexión total interna. Este último ocurre cuando un haz de luz infrarroja entra al cristal y cuando el ángulo de incidencia en la interfaz entre la muestra y el cristal es mayor que un ángulo crítico determinado por la diferencia de los índices de refracción de la muestra y el cristal (*Fig. 12*). El haz es capaz de penetrar una fracción de longitud de onda más allá de la superficie reflectante y cuando un material que absorbe selectivamente la radiación está en estrecho contacto con la superficie reflectante, el haz pierde energía en la longitud de onda donde el material absorbe. La radiación atenuada resultante se mide y se grafica en función de la longitud de onda (frecuencia de la vibración) y da lugar a las características espectrales de absorción de la muestra.

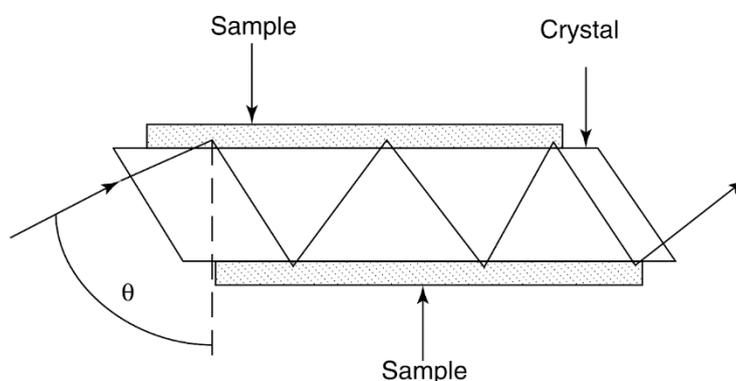


Figura 12: *esquema de un sistema de reflectancia total atenuada.*²⁰

Previo a realizar las medidas, se muelen las muestras, de manera de obtener un polvo de un tamaño de partícula menor a 150 μm , mediante la utilización de mortero y posterior tamizaje con los filtros adecuados. Se llevaron a cabo las medidas FTIR - ATR en un equipo Frontier de Perkin Elmer del Centro Universitario Regional Este (CURE - Rocha), realizando barridos en la región entre 4000 y 400 cm^{-1} , con un intervalo de datos de 2 cm^{-1} y acumulaciones de 60 barridos.

2.2.2. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica analítica conocida por ser útil para la identificación de composiciones químicas y grupos estructurales presentes en diferentes materiales. En el caso del vidrio, en particular, la utilización de la espectroscopía Raman es conveniente para el estudio de cambios en la estructura, por ejemplo, durante la cristalización, y permite identificar la presencia de iones terminales como lo son los nbO .²¹

El efecto Raman se basa en deformaciones moleculares inducidas por el campo eléctrico de la luz, y es determinado por la polarizabilidad de la molécula, α . El haz de luz utilizado puede considerarse como una onda electromagnética oscilante con un vector, ϵ . Al interaccionar con la muestra, este induce un momento eléctrico dipolar, $\mu = \alpha \epsilon$, que deforma a la molécula o grupos moleculares. Éste vibra con una frecuencia característica, que corresponde a las oscilaciones periódicas de sus átomos o iones constituyentes en sus posiciones de equilibrio.²¹

Una regla de selección cualitativa más específica fue propuesta por Almeida²²: el espectro Raman en vidrios es usualmente dominado por vibraciones *stretching* simétricas de alta frecuencia de especies aniónicas *non-bridging* sobre los cationes que forman la red, ya que estas son las vibraciones que involucran mayores cambios de polarizabilidad.²¹

Para realizar las medidas de espectroscopía Raman de las muestras de vidrio preparadas en polvo se utilizó un *Microscopio Raman Confocal WITec Alpha 300RA* (Ulm, Baden-Wurtemberg, Germany) del Polo Tecnológico de Pando con una longitud de onda de excitación de 532 nm. Se realizaron en total 100 scans con un promedio de 0.1s cada uno y se normalizaron para su comparación. Para la interpretación de los resultados se seleccionó un rango de 400 a 1800 cm^{-1} .

2.2.3. Difracción de Rayos X (XRD)

Para poder entender la relación entre la estructura y las propiedades de cualquier material, es necesario conocerlo a un nivel atómico. La difracción de rayos X de materiales cristalinos muestra picos de Bragg bien definidos asociados a su estructura ordenada de largo alcance, lo cual permite determinar los parámetros correspondientes a un grupo espacial bien definido. Aún más, para cristales individuales, los experimentos de difracción en tres dimensiones permiten determinar la estructura absoluta.

Sin embargo, el vidrio tiene una estructura inherentemente desordenada en escalas de longitud de rango intermedio y largo, lo que hace imposible la determinación estructural

absoluta, aunque el ordenamiento de corto alcance a menudo es pronunciado. En consecuencia, la mayor parte de la información que se puede extraer de manera confiable actualmente de un experimento de difracción de rayos X de un vidrio isotrópico es una función de distribución de pares unidimensional a partir de la cual la estructura tridimensional no se puede generar directamente.²³

En este caso, se utilizó la técnica para verificar el carácter amorfo de las muestras obtenidas. Los análisis fueron realizados usando un *Difractómetro Malvern Panalytical* (Almelo, The Netherlands), modelo Empyrean, del Laboratorio de Alto Impacto del CURE equipado con un tubo de cobre, midiendo a 40 kV y 40 mA, usando un filtro de Ni, una geometría Bragg-Brentano ($\theta - 2\theta$), un detector en modo 1D Xcelerator, y 0.02°/min por step. La base de datos utilizada para la identificación de las fases cristalinas fue la *Open Crystallographic Database* y *PDF+2 de la ICDD*.

2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica en donde se analiza el cambio en el flujo de calor midiendo la diferencia de temperatura entre la muestra y una muestra de referencia mientras se someten a una rampa de temperatura programada. Esto permite la caracterización de, por ejemplo, transiciones de fase de primer y segundo orden, y reacciones químicas.

Por DSC, mediante cierta calibración, se pueden realizar medidas de capacidad calorífica, lo que permite la determinación de la capacidad calorífica como una propiedad del material en un amplio rango de temperaturas en un tiempo razonablemente breve. Por lo tanto, DSC se puede utilizar para la caracterización de transiciones vítreas y otros efectos que muestran un cambio en la capacidad calorífica.²⁴

Se pueden distinguir dos modos, calorimetría diferencial de barrido de potencia compensada y calorimetría diferencial de barrido de flujo de calor, dependiendo del método de medida utilizado. Para este último, dos diseños diferentes son comunes: sistemas de medición tipo disco y tipo cilindro (*Fig. 13*).²⁴

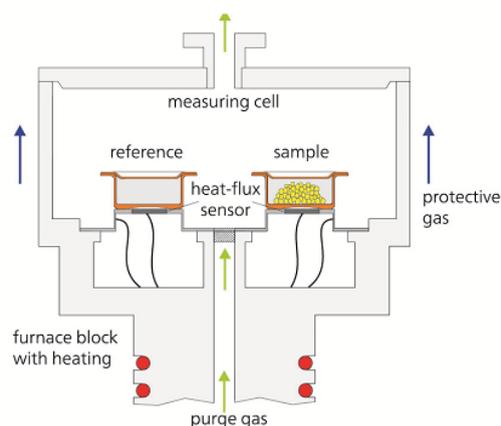


Figura 13: esquema del sistema de análisis térmico del tipo cilíndrico.

Las muestras se estudiaron por análisis térmico simultáneo (DSC-TG) en un equipo *Netsch STA-449 F5 del Centro Universitario Regional del Este (CURE)*, con crisoles de platino, atmósfera de aire con un flujo de $50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y muestras en polvo con una masa de $(20 \pm 2) \text{ mg}$. Previo a las mediciones, se realizaron calibraciones en el flujo de calor y la temperatura.

2.2.5. Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

La Resonancia Magnética Nuclear investiga el entorno local de un núcleo, permitiendo así distinguirlos para poder identificarlos y cuantificarlos. De hecho, la NMR tiene una larga historia en proporcionar información valiosa sobre la estructura del vidrio. Poco más de una década después de su invención, la NMR se utilizaba para determinar las poblaciones relativas de boros tri- y tetraédricamente coordinado en vidrios de borato alcalino.²⁵

La espectroscopía NMR es capaz de detectar espines nucleares de todos los elementos químicos. A partir de esta técnica se puede obtener información sobre el número de coordinación, el número de átomos enlazados y la conectividad. Mientras que la intensidad de los picos (u área) está directamente relacionada a la población de cada una de las especies, dando lugar a la determinación cuantitativa del orden de corto alcance. Más aún, otras interacciones de spin (e.g., cuadrupolar, spin-spin indirecto, dipolos directos) pueden también estar presentes y proveer de información adicional relevante sobre la coordinación geométrica y la conectividad. Es así que, la utilización de la NMR puede dar información

complementaria estructural de un vidrio para así construir una imagen de su estructura de manera consistente.²⁵

En este trabajo se realizó RMN de alta resolución para las especies ^{11}B y ^{31}P en un espectrómetro Bruker Avance Neo que opera en un campo de 14,1 T perteneciente al Instituto de Física, de la Universidad de San Paulo (USP), en San Carlos, Brasil. Las muestras se empaquetaron en rotores de zirconio de 3,2 mm y con una frecuencia de 15 kHz y 16 kHz para ^{31}P y ^{11}B , respectivamente. Se llevaron a cabo experimentos de ^{31}P -NMR registrando entre 200 y 600 scans dependiendo de la concentración de P en la muestra. Las medidas de ^{11}B -NMR fueron realizadas registrando 256 scans. La adquisición fue rotor-sincronizado con el período de giro del rotor para tener en cuenta toda la intensidad espectral en la banda central. Se llevaron a cabo simulaciones de las líneas ^{11}B -NMR utilizando el software DMFit²⁶, considerando los efectos eléctricos cuadrupolares de segundo orden. Para probar la proximidad espacial de ^{11}B y ^{31}P , se realizaron medidas de *Rotational echo double resonance (REDOR)* ^{11}B - $\{^{31}\text{P}\}$ en una sonda de 2,5 mm utilizando rotores de zirconio. Para ello, se realizaron experimentos separados optimizados para observación de las líneas de RMN de boro trigonal y tetragonal. Para aumentar el número de datos, los experimentos se realizaron a velocidades de giro de 13,0 y 15,0 kHz. Los cambios químicos para ^{11}B y ^{31}P fueron referenciados a soluciones acuosas de ácido bórico 0.1 M y 85% ácido fosfórico, respectivamente, utilizando una muestra sólida de BPO_4 como estándar secundario con señales de ^{11}B en $-3,5$ ppm y ^{31}P a $-29,3$ ppm.

2.3 Ensayos *in vitro*

Como ya se ha mencionado en secciones anteriores, la utilización de SBF como método para testear la bioactividad de los Bioglass debido a su capacidad de “simular” una solución iónica del tipo biológica se encuentra muy cuestionada por la comunidad científica¹⁵. Dada las dificultades que implica la preparación del SBF y la posibilidad de que precipite durante el experimento, existen reportes que sugieren la utilización de una solución de K_2HPO_4 ⁹ con una incubación a 37°C ya que sería una forma menos laboriosa y que serviría para la evaluación. En este trabajo se decide utilizar, adicionalmente, un medio de cultivo celular ya que representaría un medio más adecuado para la realización del estudio. Por lo tanto, se utilizará el SBF preparado según el protocolo presentado por Kokubo et al.¹⁵ y para los estudios se usará la misma relación masa/solución que se utiliza en dicho trabajo para estudiar la disolución de estos compuestos por pérdida de masa.

A los efectos de evaluar la posible cristalización de HA, para esta instancia se propuso estudiar la disolución de las muestras $x = 0, y = 0$ y $x = 0, y = +2$, que fueron las que resultaron vítreas, en SBF, K_2HPO_4 0.02 mol/L, y en medio de cultivo RPMI + 10% SFB (suero fetal bovino) en presencia de antibióticos (estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ y penicilina 100 U/mL), y hacer un seguimiento de la pérdida de masa al día 1, 3 y 7. Esto se realiza por triplicado para cada muestra en cada disolución y se utiliza como control de disolución vidrio Pyrex®, que es un vidrio borosilicato de uso común en el laboratorio. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio del Área Inmunología/Departamento de Biociencias - Facultad de Química, Instituto de Higiene.

Experimentalmente, se estudió la disolución de 75 mg de muestra (tamaño de partícula entre 45 – 90 μm) previamente desinfectada en luz UV por 30 min. en 50 mL de solución estéril (RPMI estéril, y SBF y K_2HPO_4 0.02 mol/L previamente filtrado con filtro 0.20 μm) sobre tubo Falcon y trabajando en flujo laminar horizontal, las cuales fueron incubadas en estufa a 37 °C según los tiempos establecidos en la Tabla 2 de forma independiente. Para maximizar la superficie de interacción muestra-solución durante la incubación, se posicionan los tubos en orientación horizontal en la estufa y se realizan agitados de ellos dos veces por día para así evitar que las partículas precipiten juntas. Al retirar las muestras, se centrifugaron por 5 min a 3000 g y 21 °C para separarlo de la solución. Luego, se retira el sobrenadante y se filtra la muestra con posteriores lavados en un filtro tipo HA con un tamaño de poro de 0.45 μm y 33 mm de diámetro, y se secan por 5.5 horas a 37 °C para después masarlo. La pérdida de masa se calculó en función de la masa inicial previo al ensayo de disolución, y la masa final, luego de filtrado y secado. Finalmente, se analizan las muestras por FTIR luego del proceso de disolución.

Tabla 2: Esquema de los ensayos de disolución realizados.

Muestra	Disolución	Día de extracción
	SBF	
3		
7		
K_2HPO_4 0.02 mol/L		1
		3
		7
RPMI		1
		3
		7



Figura 14: *Proceso de secado de las muestras luego de filtrado y sobre sus respectivos filtros (izquierda), y tubos en proceso de incubación (derecha), se colocan en posición horizontal para maximizar la superficie de interacción muestra – solución.*

3. Resultados y discusión

3.1 Preparación de bioglass



Figura 15: *Proceso de preparación de los BGs (arriba) y muestras obtenidas (abajo). La muestra izquierda corresponde a $y = 0, x = 0$ y a la derecha a $x = -2, y = -2$.*

Durante la preparación se observó que aquellas muestras con un contenido de P_2O_5 de un 4.6% (i.e. $x = -2$) presentaban una coloración blanquecina y opaca, y no translúcida como lo eran el resto de las muestras. Esto podría ser un indicio de que algún fenómeno, como la cristalización o separación de fases, haya ocurrido al enfriar la muestra.

3.2 Caracterización

Teniendo en cuenta la ecuación de variación de las muestras, $(46.1 + x)B_2O_3 \cdot (2.6 - x)P_2O_5 \cdot (26.9 + y)CaO \cdot (24.4 - y)Na_2O$, se presentan a continuación los resultados de la caracterización.

En la *Fig. 16* se presentan los espectros FTIR y Raman normalizados en función de las modificaciones en la cantidad de formadores (x) y modificadores (y) de red propuestos. Se puede observar que a medida que se aumenta la cantidad de P_2O_5 (desde $x = +2$ a $x = -2$), tanto en la *Fig. 16 a)* como *b)*, se evidencia un cambio en los perfiles de las bandas. La asignación de las respectivas bandas permite determinar estructuras en la muestra, por ejemplo, la presencia de diboratos y dipentaboratos.

Las bandas del espectro FTIR identificadas en las muestras son: 709 - 715, 771 - 777, 857 - 880, 910 - 950, 1042 - 1050, 1186 - 1218 y 1326 - 1362 cm^{-1} . Los vidrios boratos poseen sus bandas características entre 1550 - 1150 cm^{-1} , lo que corresponde a los estiramientos de B-O y B-O⁻ en los grupos $B\emptyset_3$, 1150 - 800 cm^{-1} , correspondiente a los estiramientos B-O de los grupos BO_4 ²⁷, y 800 - 600 cm^{-1} que se correlaciona con el *bending* B-O-B.²⁸ Por otra parte, los vidrios fosfato poseen bandas en 1325 - 1265 cm^{-1} que se suelen asignar a la vibración *stretching* antisimétrica de O-P-O, 1130 - 830 cm^{-1} suele adjudicarse a *stretching* antisimétricos P-O-P y la banda 780 - 725 cm^{-1} a vibraciones de estiramiento simétrico P-O-P²⁹.

En la *Fig. 16 b)*, el espectro Raman de las muestras estudiadas, se pueden identificar cuatro regiones principales: 1600 - 1200, 1100 - 800, 800 - 600 y 600 - 400 cm^{-1} . La interpretación de los resultados obtenidos se realizó comparando con datos de bibliografía previa.

Dada la aplicación deseada, el vidrio debería tener una estructura abierta, capaz de interaccionar con el medio y disolverse rápidamente en solución, formando una capa de hidroxiapatita en la superficie del mismo. Tomando en cuenta que la cantidad de P_2O_5 en las muestras es relativamente baja en porcentaje, se espera que la estructura del vidrio presente principalmente las características de una a una estructura de red de borato. Dada la cantidad de modificadores presentes, sodio y calcio, se esperaría que el modelo estructural del vidrio posea unidades del tipo $B\emptyset_4$, $B\emptyset_2O^-$ y $B\emptyset O_2^-$ ³⁰.

Para la interpretación de los espectros Raman y FTIR, se compararon y agruparon las muestras en función de su contenido de P_2O_5 .

En los espectros obtenidos por FTIR (*Fig. 16 a*)), se observa que las muestras con baja cantidad de P_2O_5 ($x = +2$) muestran señales a $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ y en el rango $860\text{-}890\text{ cm}^{-1}$ que se puede atribuir a grupos tetraborato (triboratos y pentaboratos)³¹. Cuando el contenido de P_2O_5 aumenta ($x = 0$, $x = -2$), la banda $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ incrementa su intensidad, lo que se atribuye a la superposición de la banda de vibración simétrica de O-P-O²⁹. Hay un aumento en la banda $860 - 890\text{ cm}^{-1}$ con el aumento de P_2O_5 . Por otro lado, con el aumento en el porcentaje de B_2O_3 (desde $x = -2$ a $x = +2$) se observa un incremento de la banda $1320 - 1360\text{ cm}^{-1}$ que puede deberse a la presencia de uniones del tipo nbO que varían con la relación Ca^{2+}/Na^+ presente. Mayores cantidades de Ca^{2+} ($y = +2$) dan como resultado una disminución de dicha banda. Este efecto no se encuentra presente en las muestras con 0.6% (mol) de P_2O_5 ($x = +2$).

El corrimiento de la frecuencia de vibración en $\sim 1361\text{ cm}^{-1}$ con el aumento en la cantidad de P_2O_5 (desde $y = -2$ a $y = +2$) se puede explicar por la superposición con la banda de vibración de estiramiento antisimétrico del enlace O-P-O²⁹. La banda a $\sim 940\text{ cm}^{-1}$ es debida a la presencia de diborato³² y a su vez por la superposición de la banda correspondiente a la vibración simétrica del enlace P-O³³, lo que se observa con el aumento en el contenido de P_2O_5 (de $x = +2$ a $x = -2$). La banda a $\sim 710\text{ cm}^{-1}$ se puede relacionar con la vibración de los enlaces B-O-B de la unión de los grupos $B\emptyset_3$ - $B\emptyset_4$ ³¹. A medida que el contenido de P_2O_5 aumenta, surge la presencia de una banda a $\sim 775\text{ cm}^{-1}$, que se correspondería a la vibración simétrica de los enlaces P-O-P²⁹.

Los espectros Raman de vidrios que contienen mismas cantidades de Na_2O y B_2O_3 poseen señales características a 545, 690, 757, 940, 1490 cm^{-1} , las cuales corresponden a grupos estructurales del tipo BO_3 y BO_4 y una red depolimerizada, con grupos tales como anillos metaboratos y piroboratos (*Fig. 5* y *Fig. 6*)³⁴. Mientras tanto que, vidrios que poseen 33% P_2O_5 · 67% CaO tienen bandas a 1106, 1045, 952, 745 y 354 cm^{-1} las cuales se han asignado a vibraciones de unidades orto- y pirofosfato³⁵. Aquellos vidrios con composición 33% P_2O_5 · 67% SnO muestran bandas a 745, 925, 985 y 1100 cm^{-1} que han sido asignadas a modos *stretching* de vibración de bO de Q^1 , Q^1 , nbO en ortofosfatos Q^0 tetraédricos y Q^1 como terminador de cadena, respectivamente³⁶.

En el espectro Raman, se puede observar que a bajos contenidos de P_2O_5 ($x = +2$) los vidrios tienen sus bandas principales a 480, 748, 893, 960, 1010 y 1438 cm^{-1} , lo cual se correspondería a las bandas de las estructuras de borato de anillos de seis miembros con un BO_4 e iones nbO. En estudios anteriores, se ha visto que los vidrios con una composición

50% B_2O_3 ·50% CaO muestran señales similares y bandas a 930 cm^{-1} y 735 cm^{-1} , lo cual se ha asignado a ortoborato y metaborato, respectivamente³⁷. La banda en 748 cm^{-1} podría deberse a la presencia de pequeñas cantidades de P_2O_5 , debido a la superposición con la vibración asimétrica de P-O-P de las especies fosfato³⁸ y con una banda que se centra en 745 cm^{-1} en vidrios $CaO\cdot B_2O_3$. En la señal a 940 cm^{-1} ocurre algo similar, donde a medida que la concentración de P_2O_5 aumenta, la señal aumenta su intensidad. Una concentración 2.6% P_2O_5 ($x = 0$) da una banda a 945 cm^{-1} mayor que el resto de las concentraciones. Se ha reportado que vidrios de composiciones $Na_2O\cdot P_2O_5$ con iguales cantidades de Na_2O y P_2O_5 poseen bandas características principalmente en la región $1150 - 1195$ y $636 - 687\text{ cm}^{-1}$ ³⁹, sin embargo, estas señales no son posibles de observar debido al bajo contenido de P_2O_5 respecto a Na_2O .

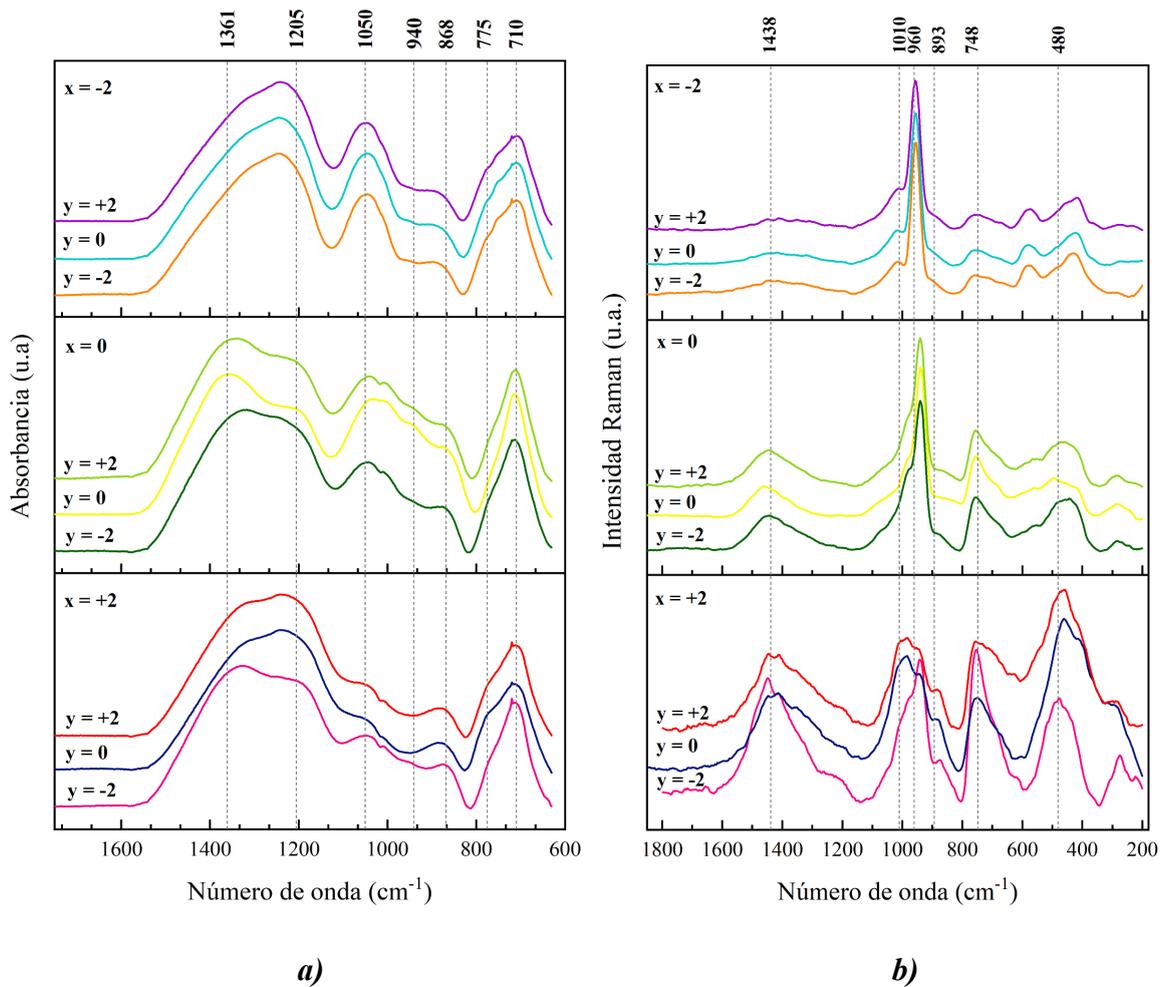


Figura 16: Espectros normalizados de FTIR-ATR (a) y de Raman (b) de las nueve muestras obtenidas. Se indican líneas de referencia

De las medidas por DSC (*Fig. 17 a*)), se puede extraer información sobre la transición vítrea y la ocurrencia de eventos de cristalización. La temperatura de transición vítrea (T_g) es una medida de la conectividad de la red. Se observa que, para las tres concentraciones de fosfato, la T_g aumenta con el agregado de Ca (aumenta con y). En otras palabras, esto significa una red con una interacción más fuerte (*Fig. 18*). En todas las muestras se observa un pico de cristalización. Este pico de cristalización podría deberse a la cristalización de una fase a partir de la matriz vítrea. Adicionalmente, se observan picos de fusión correspondiente, en algunos casos, a la presencia de más de una fase cristalina.

Por XRD (*Fig. 17 b*)), se puede evidenciar que, para alto contenido de fosfato ($x = -2$), las muestras de vidrio cristalizan parcialmente al enfriar. No se encontró una fase cristalina ya reportada (en la base de datos Crystallographic Open Data Base ni en la PDF+2) que tenga dicha estructura con los elementos que se encuentran en la muestra. La resolución de una fase cristalina no reportada por el método de Rietveld escapa del objetivo del presente trabajo.

Mientras que, para bajo contenido de fosfato ($x = +2$) se observan picos de cristalización que podrían ser asociados a la fase cristalina $AlPO_4$. Este aluminio proviene del crisol de alúmina utilizado para crear las muestras, que, como ya se mencionó, a altas temperaturas podría transferir dicho aluminio al vidrio, y en este caso cristaliza con la relativa baja cantidad de fosfato de estas muestras respecto a las demás. Por último, las muestras con 2.6 % de P_2O_5 son las que no cristalizan y, por tanto, se confirma el estado vítreo. Teniendo en cuenta lo anterior, lo que estaría cristalizando al calentar sería una fase correspondiente a boratos.

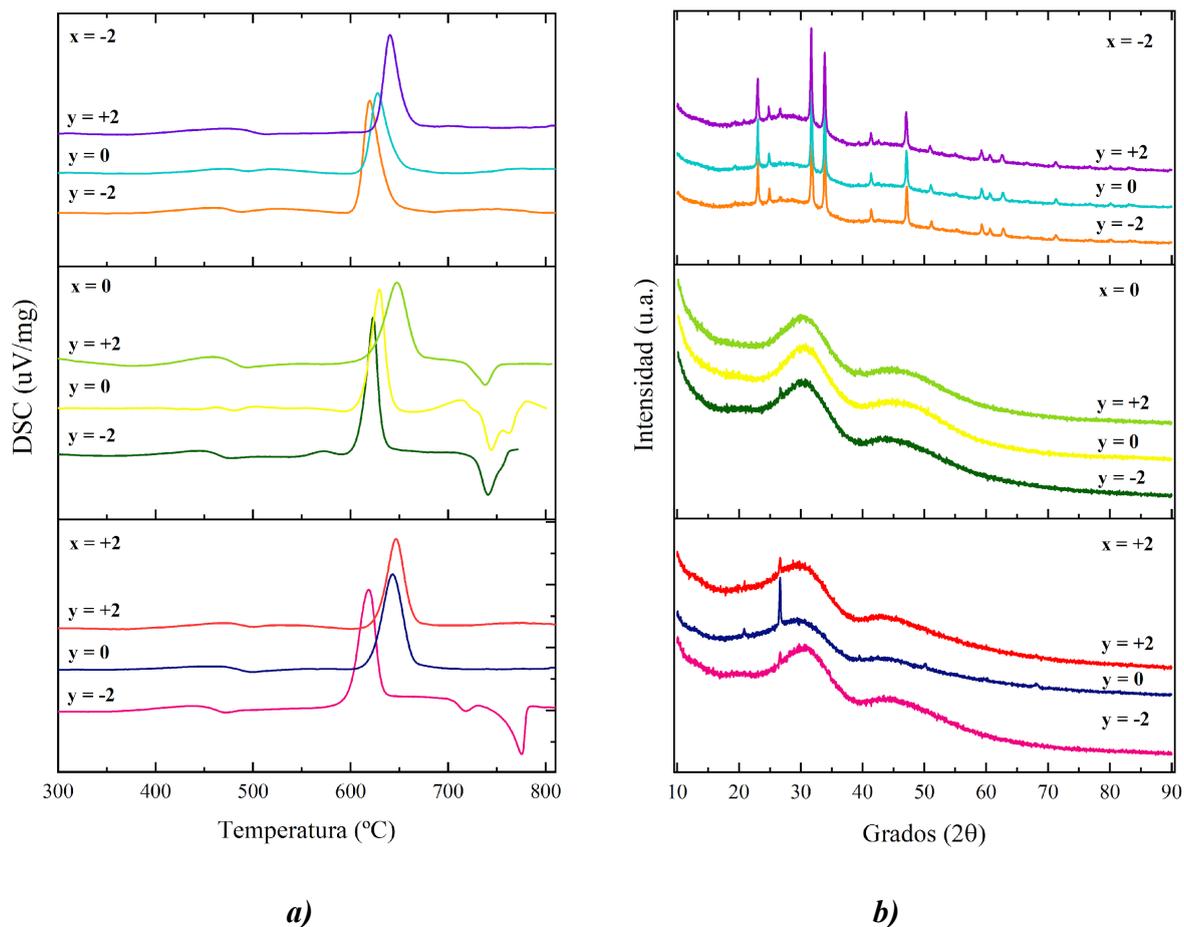


Figura 17: Gráficos obtenidos del análisis DSC (a) y espectros de XRD de las muestras (b).
 En a) los procesos exotérmicos son hacia arriba y endotérmicos hacia abajo.

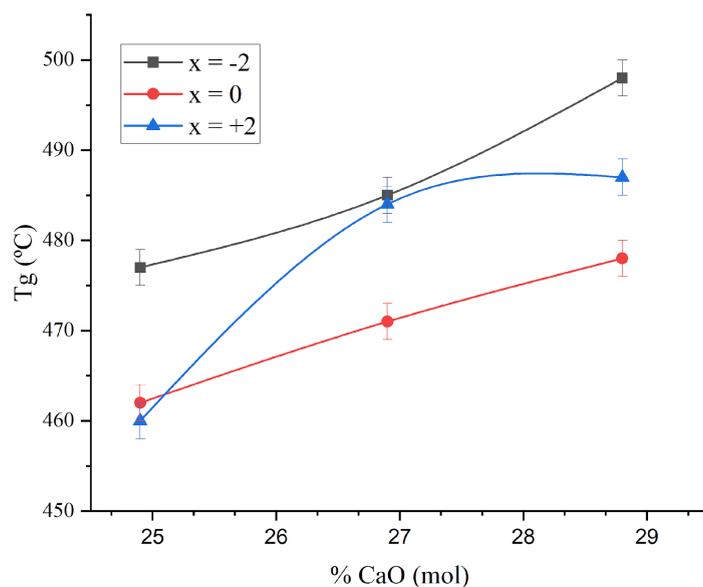


Figura 18: Variación de T_g en función de la concentración de CaO. Se aprecia que no mantienen la misma tendencia en las diferentes proporciones de P_2O_5 : B_2O_3 , es decir con x.

Los espectros de ^{31}P -RMN (*Fig. 19 a*) muestran una resonancia con máximos entre 3 ppm y 6ppm para las muestras. Este desvío químico indica que las especies predominantes de fosfato son tetraedros de tipo Q^0 , sin puentes P-O-P entre ellos. Por lo tanto no estarían formando una red y tampoco parece interactuar con la red de boratos.

Es bien conocido el efecto de iones con mayor potencial Coulombiano de desviar la resonancia de ^{31}P a frecuencias menores⁴⁰. Es así que, se puede concluir que la región espectral de alta frecuencia corresponde a tetraedros cuyos O se encuentran interactuando principalmente con Na^+ , mientras que la asimetría de bajas frecuencias indica la presencia de tetraedros con un número progresivamente mayor de O interactuando con Ca^{2+} en lugar de Na^+ . La asimetría observada en los espectros se puede intuir que la interacción de los grupos PO_4 con Ca es proporcionalmente mayor en los vidrios con menor concentración de P.

En la *Fig. 19 b*), correspondiente a los espectros ^{11}B -RMN se observa la presencia de B en coordinación trigonal y tetragonal, B(3) y B(4), respectivamente. Se detectó en los espectros la presencia de un segundo sitio de coordinación trigonal, identificado como B(3)b, por lo que habría 3 tipos de B(3), con entornos diferentes.

La distribución de B en coordinación trigonal y tetraédrica se obtuvo por la integración de las simulaciones, y se muestra en la *Fig. 20* en función de la concentración de CaO. Se observa que, en las muestras que poseen mayor proporción de B(4) son aquellas con un contenido medio de B_2O_3 en sus tres variaciones de CaO, y el vidrio con alto B_2O_3 y bajo contenido de CaO. Por otro lado, se aprecia que en $x = 0$ (2.6% de P_2O_5), al aumentar la concentración de CaO hay una tendencia a aumentar B(4), y consecuentemente, una disminución de B(3), esto se debe a la capacidad del Ca^{2+} de unir la red de B, debido a su carga. El caso de $x = -2$, se explica por su alto contenido de P_2O_5 (4.6% de P_2O_5), ya que el fosfato presente no es capaz de formar una red, se encontrará de forma libre en la muestra y, con el aumento de CaO, habrá mayor cantidad de CaO por unidades de B, se decir, proporcionalmente se reduce la cantidad de unidades B al agregar P_2O_5 . Finalmente, en $x = +2$, no hay un cambio global en la tendencia, tanto B(3) como B(4) son constantes con el aumento de CaO. Este conjunto de muestras también presentaba una fase cristalina (*Fig. 17 b*)), la cual se atribuyó a AlPO_4 , una cristalización afectada por el aluminio presente en el crisol durante la preparación de los vidrios, lo que hace que el poco P_2O_5 disponible se pierda en la formación de esa fase cristalina, y todo el Ca^{2+} se encuentre en red con el boro, por lo tanto, la proporción de CaO respecto a B cambia en comparación al resto de las muestras. En $x = -2$, $y = -2$, según los datos de XRD (*Fig. 17 b*)) parte del CaO del vidrio podría perderse debido a la cristalización de alguna especie que contenga Ca.

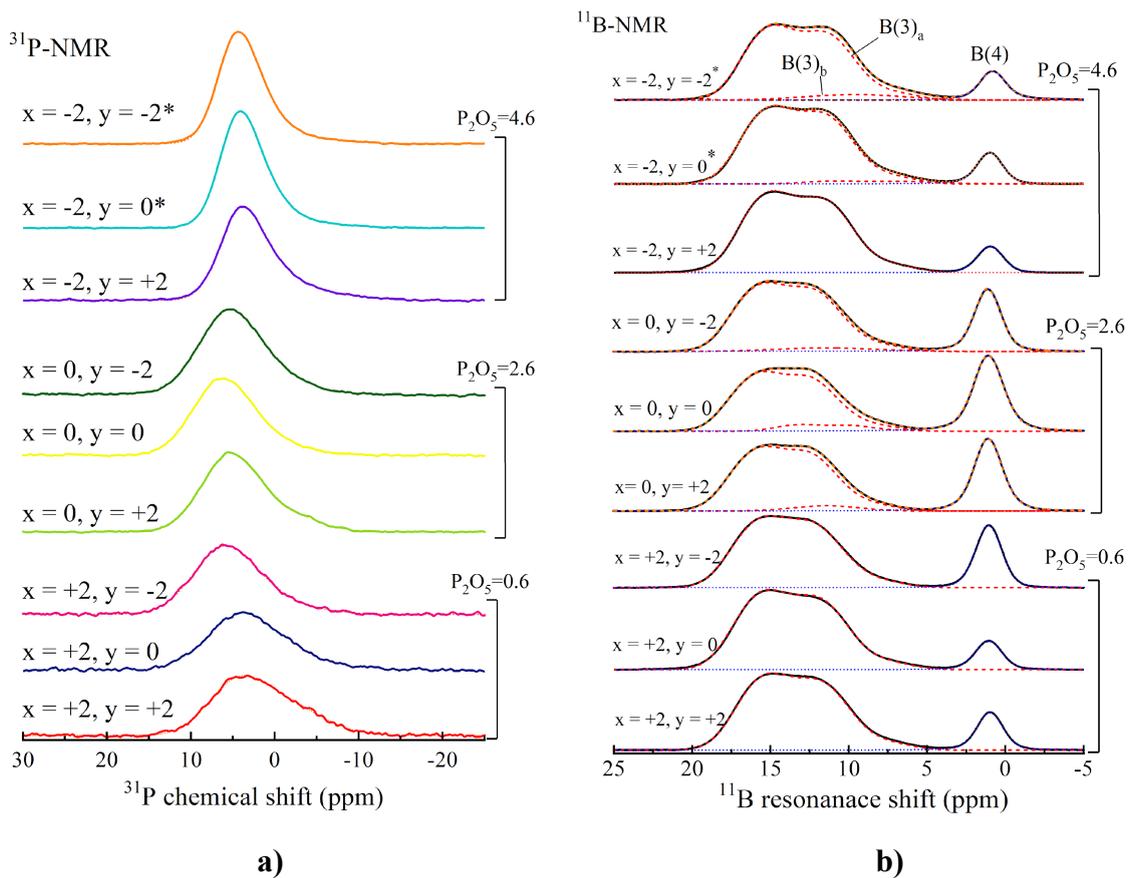


Figura 19: espectros de ^{31}P -RMN (a) y (b) espectros de ^{11}B -RMN (líneas continuas negras), simulaciones de resonancias de B en coordinación trigonal, B(3), (líneas de trazos rojas) y de coordinación tetragonal, B(4), (líneas de puntos azules), y simulación total (líneas de trazos naranja).

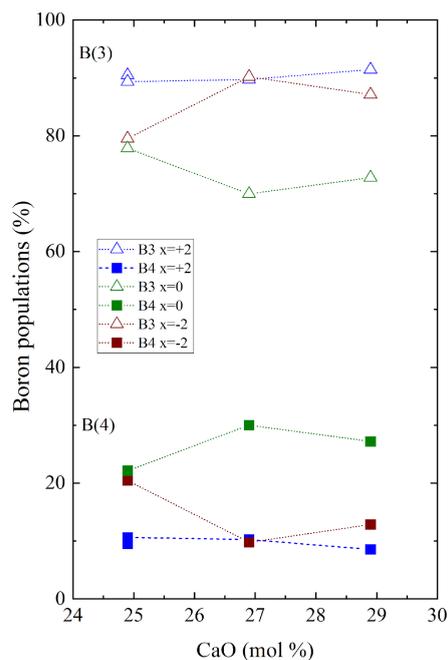


Figura 20: poblaciones de boro trigonal (B(3), triángulos) y tetraédrico (B(4), cuadrados).

3.3 Ensayos *in vitro*

A nivel de los ensayos de pérdida de masa para la muestra $x = 0, y = 0$ (*Fig. 21 a*) se observa que ocurrió una mayor pérdida de masa en SBF durante todo el tiempo del ensayo respecto al resto de las disoluciones, y finalizó en una disminución del ~52% de peso total. Esto sería la mayor tasa de disolución obtenida. En la muestra control se obtiene una pérdida menor del 10 %. Por otro lado, la misma muestra, pero incubada en RPMI y en solución de K_2HPO_4 tuvo una pérdida de masa final entre 10-20%, siendo mayor la solución de K_2HPO_4 . Cabe comparar que la concentración de K_2HPO_4 en SBF es aproximadamente 0.001 mol/L (ver composición de SBF en *Anexo.1*), mientras que la solución de K_2HPO_4 utilizada posee una concentración 20 veces mayor. Por lo que, si la tasa de disolución en el SBF se viera favorecida por el K_2HPO_4 , se esperaría que la solución K_2HPO_4 0.02 mol/L tuviera algún comportamiento similar o sea más eficiente en la disolución. Por otra parte, el análisis de la disolución en RPMI, cuya composición no sólo consta de sales inorgánicas, sino que posee una gran cantidad de aminoácidos y vitaminas (composición de RPMI en *Anexo.2*) lo que aporta compuestos y metabolitos compatibles con el medio biológico y fisiológico, da otra mirada de la bioactividad de la muestra y una respuesta de cómo podría comportarse en un medio donde puedan vivir y desarrollarse nuevas células. Por otro lado, un aumento de la cantidad Ca^{2+} con respecto a la composición anterior muestra una disminución de la disolución, lo que estaría asociado a un aumento de la conectividad y por ende una mayor estabilidad de la red. Para poder interpretar si estos resultados de disolución se corresponden con la formación de HA, se deben analizar los espectros FTIR de las muestras.

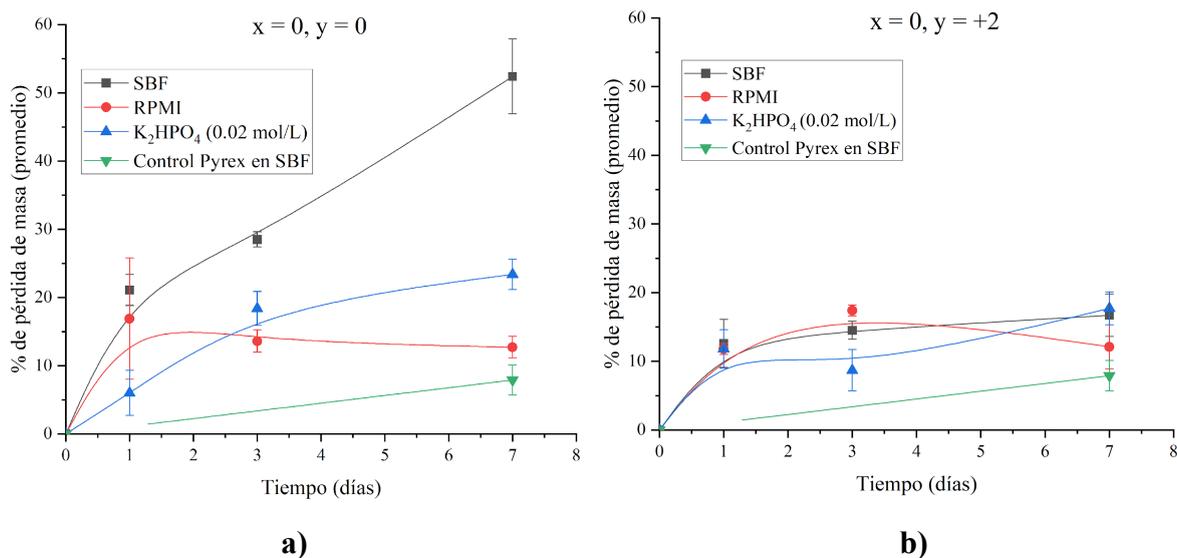


Figura 21: ensayos de disolución en porcentaje de pérdida de masa en función del tiempo, donde a) corresponde a la muestra $x = 0, y = 0$, y b) a $x = 0, y = +2$.

Al observar los espectros FTIR de las muestras $x = 0, y = 0$ en las diferentes disoluciones y en los diferentes días (Fig. 22 a), c) y e)) se puede concluir que en el tiempo ocurren globalmente los mismos cambios: una disminución relativa y corrimiento de las bandas en la región $1540 - 1140 \text{ cm}^{-1}$ las cuales, como se mencionó en la sección 3.2, corresponden a los estiramientos B-O y B-O⁻ en los grupos BO_3 ; una disminución de la señal en la región $800 - 600 \text{ cm}^{-1}$, donde el pico a $\sim 710 \text{ cm}^{-1}$ se relacionaba principalmente con la vibración de los enlaces B-O-B de la unión de los grupos BO_3 - BO_4^{31} ; la presencia de un pico $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ el cual se atribuye al modo *bending* (ν_2) del agua¹², la aparición de esta señal es evidencia de que cuando se sumerge la muestra en la solución existe un proceso de intercambio iónico de hidrógenos o iones hidronio del medio y los iones sodio de la superficie del vidrio¹⁶; y una transformación de la señal entre $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$ en donde ocurren dos fenómenos: disminuye el aporte en la señal de las vibraciones B-O *stretching* de BO_4 , correspondientes a tetraboratos ($860 - 890 \text{ cm}^{-1}$) y diboratos ($940 - 960 \text{ cm}^{-1}$), y el pico en $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ se agudiza debido a la presencia de una estructura más cristalina cuya vibración se suele atribuir a los modos *stretching* P-O, y ésta es uno de los principales indicativos en la formación de HA^{12,16}. Esto quiere decir que al reducirse los BO_4 , la red borato se abre y a la vez incorpora fósforo, dando posibilidad a la formación de HA.

El vidrio $x = 0, y = +2$ (+2% CaO%) tuvo un comportamiento notablemente diferente a $x = 0, y = 0$ tanto en los ensayos de pérdida de masa (Fig. 21 b)) como en los espectros FTIR obtenidos (Fig. 22 b), d) y f)). La tasa de pérdida de masa para esta muestra no llegó al

20% para ninguna de las soluciones, sin embargo, cabe destacar que en la disolución K_2HPO_4 desde el día 3 al 7 hubo una disminución en masa de la muestra de $\sim 10\%$. En los espectros FTIR, se concluye que los cambios observados son relativamente menores con respecto a la muestra anterior. Los cambios más significativos tuvieron lugar en el día 7 tanto en RPMI como en K_2HPO_4 . En el primer caso, *Fig. 22 d*), se observa que en la región $1100 - 1600\text{ cm}^{-1}$ hay un cambio en los tipos de compuestos $B\text{O}_3$ presentes, y pasa a predominar la banda $1247 - 1268\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a unidades estructurales BO_3 triangulares¹⁷. Por otro lado desaparece la señal en $940 - 960\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las unidades $B\text{O}_4$ de diboratos, dejando en evidencia el pico en $\sim 870\text{ cm}^{-1}$, característico de las vibraciones stretching B - O de anillos boroxol¹². Estos procesos, se traducen en el “desarmado” de la red de borato al disminuir la cantidad relativa de unidades $B\text{O}_4$ en la muestra. A su vez, se ve un aumento del pico en $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$, lo que indica, de alguna forma, la incorporación de fosfato. Por lo que, en este caso, ocurren dos procesos: una disminución de las especies $B\text{O}_4$ y una transformación de las especies $B\text{O}_3$, y la simultánea formación de HA. Adicionalmente se observa la presencia del pico $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al modo *bending* (ν_2) del agua¹², confirmando la interacción con el medio. Finalmente, la misma muestra pero al día 7 de incubada en K_2HPO_4 0.02 mol/L (*Fig. 22 f*)) tiene un perfil muy similar a lo mencionado anteriormente, pero tiene un efecto más pronunciado, ya que en el último periodo de incubación la muestra disminuyó su masa en un casi 10% , lo que luego se comprueba con un mayor cambio en las señales del espectro FTIR y en una mayor tasa de formación de HA respecto al resto de las soluciones. Esto último se podría explicar por un efecto de la cinética de disolución de la muestra. El vidrio $x = 0, y = +2$ posee una mayor Tg que $x = 0, y = 0$ ya que posee un mayor contenido de CaO (*Fig. 18*), esto se traduce en una red más rígida y compacta, por lo que el acceso y eliminación de iones en éste sería más dificultoso y, por lo tanto, la disolución del vidrio se enlentecería.

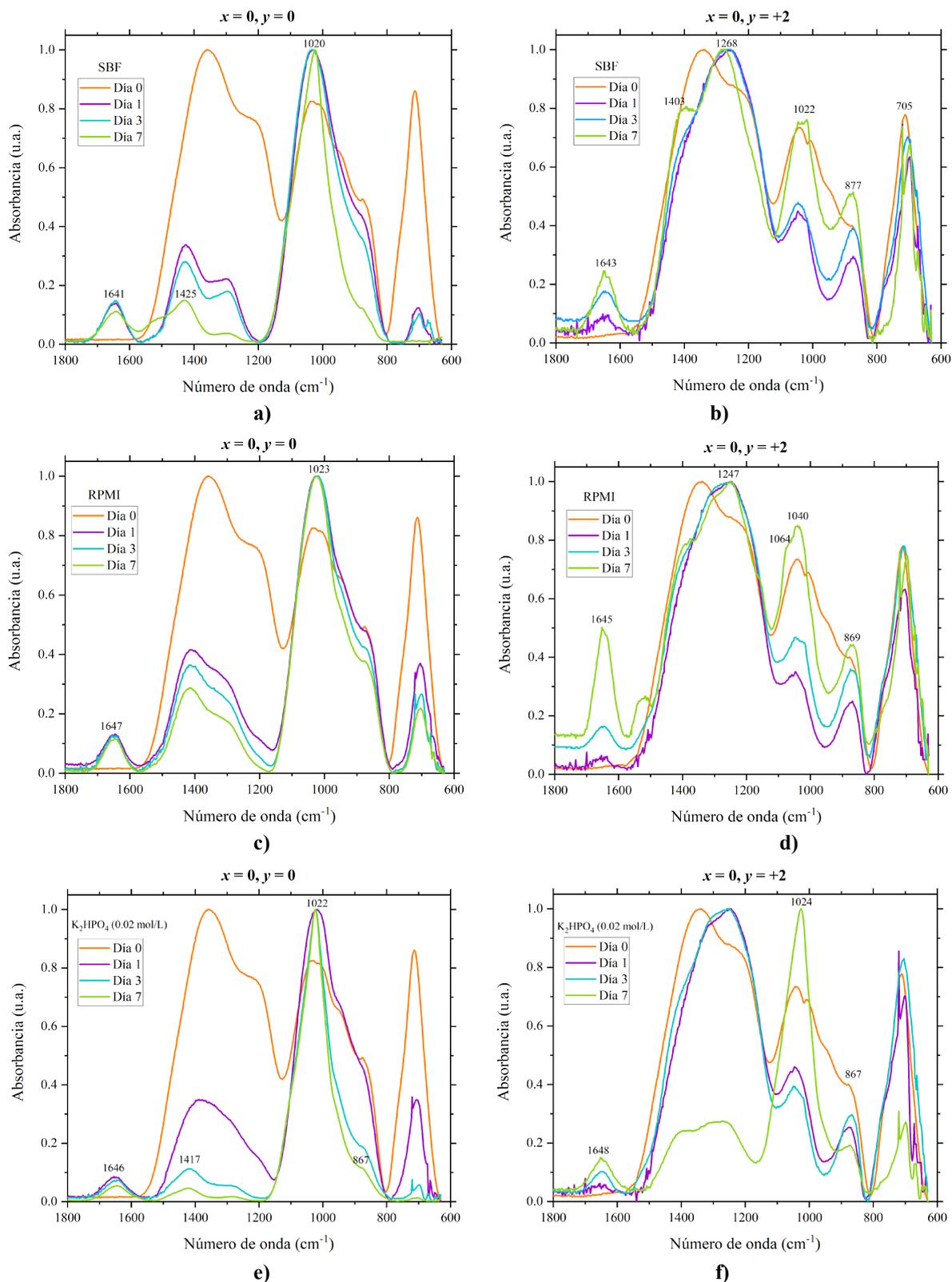


Figura 22: espectros FTIR normalizados de los ensayos de disolución.

4. Conclusión

En este trabajo se buscó analizar cómo la variación en la composición en 2% de modificadores y formadores de red en un Bioglass previamente estudiado, modificaba tanto la estructura, las propiedades térmicas, como la bioactividad de este. También, por otro lado, se investigó los métodos por los cuales se evalúa dicha bioactividad. Es así que, se deduce que un aumento en 2% mol de CaO y disminución de 2% de Na₂O respecto al Bioglass 45B5, permite mantener el estado vítreo. Este aporte de Ca²⁺ y disminución de Na⁺ causa que el vidrio tenga una estructura más rígida, ya que el Ca²⁺ debido a su carga es capaz de unir boros, esto se traduce en una Tg mayor y en una dinámica de disolución diferente y más enlentecida a la del vidrio propuesto por Lepry. Por otro lado, un aumento en la cantidad de formador de red produce grandes modificaciones en el sistema; cristalización de una fase no reportada al momento, y una disminución en las propiedades térmicas del material.

Los ensayos de disolución permitieron concluir que, aunque el SBF es un buen indicador de la bioactividad, la disolución de una misma muestra en una solución más compleja y similar al medio biológico, como es un medio de cultivo, no es tan efectiva, y por lo tanto podría estar sobreestimando su capacidad de disolución.

Una posible perspectiva a futuro es poder realizar los mismos ensayos disolución *in vitro* pero con muestras obtenidas a partir del método *sol-gel*, además de testear el comportamiento de estos vidrios en un contexto de tejido celular, y, a largo plazo, hacer los ensayos *in vivo*.

Bibliografía

- (1) Glossary of Terms | <https://www.nibib.nih.gov/science-education/glossary> (accessed May 15, 2021).
- (2) Ribas, R. G.; Schatkoski, V. M.; Montanheiro, T. L. do A.; de Menezes, B. R. C.; Stegemann, C.; Leite, D. M. G.; Thim, G. P. Current Advances in Bone Tissue Engineering Concerning Ceramic and Bioglass Scaffolds: A Review. *Ceram. Int.* **2019**, *45* (17), 21051–21061. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>.
- (3) Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5* (6), 117–141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- (4) O'Donnell, M. D. Melt-Derived Bioactive Glass. *Bio-Glasses An Introd.* **2012**, 13–27. <https://doi.org/10.1002/9781118346457.ch2>.
- (5) Brauer, D. S.; Möncke, D. Introduction to the Structure of Silicate, Phosphate and Borate Glasses. In *Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and Applications*; The Royal Society of Chemistry, **2017**, pp 61–88. <https://doi.org/10.1039/9781782622017-00061>.
- (6) Balasubramanian, P.; Büttner, T.; Miguez Pacheco, V.; Boccaccini, A. R. Boron-Containing Bioactive Glasses in Bone and Soft Tissue Engineering. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2018**, *38* (3), 855–869. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>.
- (7) Jung, S. B. Bioactive Borate Glasses. *Bio-Glasses An Introd.* **2012**, 75–95. <https://doi.org/10.1002/9781118346457.ch6>.
- (8) Ali, A.; Singh, B. N.; Yadav, S.; Ershad, M.; Singh, S. K.; Mallick, S. P.; Pyare, R. CuO Assisted Borate 1393B3 Glass Scaffold with Enhanced Mechanical Performance and Cytocompatibility: An In Vitro Study. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2021**, *114* (November 2020), 104231. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104231>.
- (9) Huang, W.; Day, D. E.; Kittiratanapiboon, K.; Rahaman, M. N. Kinetics and Mechanisms of the Conversion of Silicate (45S5), Borate, and Borosilicate Glasses to Hydroxyapatite in Dilute Phosphate Solutions. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17* (7), 583–596. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-9220-z>.
- (10) Kaur, G.; Pickrell, G.; Sriranganathan, N.; Kumar, V.; Homa, D. Review and the State of the Art: Sol–Gel and Melt Quenched Bioactive Glasses for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2016**, *104* (6), 1248–1275.

- <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33443>.
- (11) Lepry, W. C.; Nazhat, S. N. A Review of Phosphate and Borate Sol–Gel Glasses for Biomedical Applications. *Adv. NanoBiomed Res.* **2021**, *1* (3), 2000055.
<https://doi.org/10.1002/anbr.202000055>.
 - (12) Lepry, W. C.; Nazhat, S. N. Highly Bioactive Sol-Gel-Derived Borate Glasses. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (13), 4821–4831. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01697>.
 - (13) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science*; Academic Press, **1990**.
<https://doi.org/10.1016/c2009-0-22386-5>.
 - (14) Fagerlund, S.; Hupa, L. Melt-Derived Bioactive Silicate Glasses. In *Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and Applications*; The Royal Society of Chemistry, **2017**, pp 1–26. <https://doi.org/10.1039/9781782622017-00001>.
 - (15) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
 - (16) Manupriya; Thind, K. S.; Sharma, G.; Singh, K.; Rajendran, V.; Aravindan, S. Soluble Borate Glasses: In Vitro Analysis. *J. Am. Ceram. Soc.* **2007**, *90* (2), 467–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01449.x>.
 - (17) Abo-Naf, S. M.; Khalil, E. S. M.; El-Sayed, E. S. M.; Zayed, H. A.; Youness, R. A. In Vitro Bioactivity Evaluation, Mechanical Properties and Microstructural Characterization of Na₂O–CaO–B₂O₃–P₂O₅ Glasses. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *144*, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.02.076>.
 - (18) Lepry, W. C.; Smith, S.; Nazhat, S. N. Effect of Sodium on Bioactive Sol-Gel-Derived Borate Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **2018**, *500* (May), 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.07.042>.
 - (19) Stuart, B. H. Introduction. In *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Ando, D. J., Ed. Wiley, **2004**, Vol. 8, pp 1–16.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0470011149.ch1>.
 - (20) Stuart, B. H. Experimental Methods. In *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Ando, D. J., Ed. Wiley, **2004**, Vol. 8, pp 15–44.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0470011149.ch2>.
 - (21) Almeida, R. M.; Santos, L. F. Raman Spectroscopy of Glasses. In *Modern Glass Characterization*; Affatigato, M., Ed. Wiley, **2015**, pp 74–106.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119051862.ch3>.
 - (22) Almeida, R. M. Fluoride Glasses. In *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare*

- Earths*; Elsevier Science Publishers, **1991**, p 287.
- (23) Benmore, C. J. X-Ray Diffraction from Glass. In *Modern Glass Characterization*; Affatigato, M., Ed. Wiley, **2015**, pp 241–270.
<https://doi.org/10.1002/9781119051862.ch6>.
- (24) Schick, C.; Lexa, D.; Leibowitz, L. Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis. In *Characterization of Materials*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2012**, Vol. 101, pp 1071–1077.
<https://doi.org/10.1002/0471266965.com030.pub2>.
- (25) Kroeker, S. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Glasses. In *Modern Glass Characterization*; Affatigato, M., Ed. Wiley, **2015**, pp 315–344.
<https://doi.org/10.1002/9781119051862.ch8>.
- (26) Massiot, D.; Fayon, F.; Capron, M.; King, I.; Le Calvé, S.; Alonso, B.; Durand, J. O.; Bujoli, B.; Gan, Z.; Hoatson, G. Modelling One- and Two-Dimensional Solid-State NMR Spectra. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40* (1), 70–76.
<https://doi.org/10.1002/mrc.984>.
- (27) Yiannopoulos, Y. D.; Chryssikos, G. D.; Kamitsos, E. I. Structure and Properties of Alkaline Earth Borate Glasses. *Phys. Chem. Glas.* **2001**, *42* (3), 164–172.
- (28) Kamitsos, E. I.; Patsis, A. P.; Chryssikos, G. D. Infrared Reflectance Investigation of Alkali Diborate Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **1993**, *152* (2–3), 246–257.
[https://doi.org/10.1016/0022-3093\(93\)90258-Y](https://doi.org/10.1016/0022-3093(93)90258-Y).
- (29) Abo-Naf, S. M.; Ghoneim, N. A.; El-Batal, H. A. Preparation and Characterization of Sol-Gel Derived Glasses in the Ternary Na₂O-Al₂O₃-P₂O₅ System. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2004**, *15* (5), 273–282.
<https://doi.org/10.1023/B:JMSE.0000024226.51362.de>.
- (30) Wright, A. C. Borate Structures: Crystalline and Vitreous. *Phys. Chem. Glas. - Eur. J. Glas. Sci. Technol. Part B* **2010**, *51* (1), 1–39.
- (31) Kamitsos, E. I.; Karakassides, M. A.; Chryssikos, G. D. Vibrational Spectra of Magnesium-Sodium-Borate Glasses. 2. Raman and Mid-Infrared Investigation of the Network Structure. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (5), 1073–1079.
<https://doi.org/10.1021/j100289a014>.
- (32) Kamitsos, E. I.; Patsis, A. P.; Karakassides, M. A.; Chryssikos, G. D. Infrared Reflectance Spectra of Lithium Borate Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **1990**, *126* (1–2), 52–67. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(90\)91023-K](https://doi.org/10.1016/0022-3093(90)91023-K).
- (33) Meyer, K. Characterization of the Structure of Binary Zinc Ultraphosphate Glasses by

- Infrared and Raman Spectroscopy. *J. Non. Cryst. Solids* **1997**, *209* (3), 227–239. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(96\)00563-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(96)00563-7).
- (34) Kamitsos, E. I.; Chryssikos, G. D. Borate Glass Structure by Raman and Infrared Spectroscopies. *J. Mol. Struct.* **1991**, *247* (C), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(91\)87058-P](https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)87058-P).
- (35) Saranti, A.; Koutselas, I.; Karakassides, M. A. Bioactive Glasses in the System CaO-B₂O₃-P₂O₅: Preparation, Structural Study and in Vitro Evaluation. *J. Non. Cryst. Solids* **2006**, *352* (5), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.01.042>.
- (36) Saitoh, A.; Tricot, G.; Rajbhandari, P.; Anan, S.; Takebe, H. Effect of B₂O₃/P₂O₅ Substitution on the Properties and Structure of Tin Boro-Phosphate Glasses. *Mater. Chem. Phys.* **2015**, *149*, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.11.021>.
- (37) Maniua, D.; Iliescu, T.; Ardelean, I.; Cinta-Pinzaru, S.; Tarcea, N.; Kiefer, W. Raman Study on B₂O₃-CaO Glasses. *J. Mol. Struct.* **2003**, *651–653*, 485–488. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(03\)00129-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00129-7).
- (38) Pemberton, J. E.; Latifzadeh, L.; Fletcher, J. P.; Risbud, S. H. Raman Spectroscopy of Calcium Phosphate Glasses with Varying CaO Modifier Concentrations. *Chem. Mater.* **1991**, *3* (1), 195–200. <https://doi.org/10.1021/cm00013a039>.
- (39) Hudgens, J. J.; Brow, R. K.; Tallant, D. R.; Martin, S. W. Raman Spectroscopy Study of the Structure of Lithium and Sodium Ultraphosphate Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **1998**, *223* (1–2), 21–31. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(97\)00347-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)00347-5).
- (40) Brow, R. K.; Phifer, C. C.; Turner, G. L.; Kirkpatrick, R. J. Cation Effects on ³¹P MAS NMR Chemical Shifts of Metaphosphate Glasses. *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, *74* (6), 1287–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb04099.x>.

Anexo

1. Composición de RPMI utilizado en ensayos de disolución *in vitro*



Product Information

RPMI 1640, with L-Glutamine
Cat. No. RPMI-A (500 ml)

Product Specifications

Appearance	Clear red orange solution
CO ₂ concentration, optimum	4.5 %
Storage and shelf life	Store at +2°C to +8°C protected from light. Once opened, store at 4° C and use within 6-8 weeks.
Shipping conditions	Ambient

Formulation

Components	Concentration mg/L
Amino Acids:	
Glycine	10.00
L-Arginine	200.00
L-Asparagine	50.00
L-Aspartic Acid	20.00
L-Cystine 2HCl	65.20
L-Glutamic Acid	20.00
L-Glutamine	300.00
L-Histidine	15.00
L-Hydroxy-L-Proline	20.00
L-Isoleucine	50.00
L-Leucine	50.00
L-Lysine HCl	40.00
L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	15.00
L-Proline	20.00
L-Serine	30.00
L-Threonine	20.00
L-Tryptophan	5.00
L-Tyrosine	21.84
L-Valine	20.00

Components	Concentration mg/L
Vitamins:	
p-Amino Benzoic Acid	1.00
D-Biotin	0.20
Choline Chloride	3.00
D-Calcium Pantothenate	0.25
Folic Acid	1.00
myo-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamin B12	0.005
Inorganic Salts:	
Ca(NO ₃) ₂ 4 H ₂ O	100.00
KCl	400.00
MgSO ₄	48.84
NaCl	6000.00
NaHCO ₃	2000.00
Na ₂ HPO ₄	800.00
Other Components:	
D-Glucose	2000.00
L-Glutathione Reduced	1.00
Phenol Red Sodium Salt	5.30

2. Preparación de 1000 mL de SBF según la publicación de Kokubo et al.¹⁵

Table A2

Order, amounts, weighing containers, purities and formula weights of reagents for preparing 1000 ml of SBF

Order	Reagent	Amount	Container	Purity (%)	Formula weight
1	NaCl	8.035 g	Weighing paper	99.5	58.4430
2	NaHCO ₃	0.355 g	Weighing paper	99.5	84.0068
3	KCl	0.225 g	Weighing bottle	99.5	74.5515
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.231 g	Weighing bottle	99.0	228.2220
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.311 g	Weighing bottle	98.0	203.3034
6	1.0M-HCl	39 ml	Graduated cylinder	—	—
7	CaCl ₂	0.292 g	Weighing bottle	95.0	110.9848
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g	Weighing bottle	99.0	142.0428
9	Tris	6.118 g	Weighing paper	99.0	121.1356
10	1.0M-HCl	0–5 ml	Syringe	—	—

¹ PDU Ciencias Físicas y sus Aplicaciones, CURE, Rocha y Facultad de Química