

Resum

L'objectiu d'aquest projecte és desenvolupar ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt per la substitució i regeneració de teixit ossi. Actualment, en el disseny d'un material per regeneració òssia, a més dels requeriments de biocompatibilitat, bioactivitat, reabsorció i osteoconductivitat, es busca que el material indueixi la formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi), per tal d'afavorir la generació de teixit ossi (osteogènesi). En aquest treball, l'estratègia seguida per tal de millorar la capacitat osteoinductiva d'un ciment de fosfat de calci, és el dopatge amb un element d'efecte angiogènic, com és el cobalt. És important tenir en compte, però, que aquest element, malgrat tenir un paper important en el metabolisme del teixit ossi, quan és present a concentracions que superen els 100-200 μM provoca citotoxicitat.

Els ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt es van obtenir per addició de dissolucions aquoses de clorur de cobalt, a concentracions del 0.1, 0.5 i 1% en pes, en la fase líquida del ciment. La fase en pols del ciment estava constituïda per fosfat tricàlcic- α i un 2% en pes d'hidroxiapatita precipitada. L'addició del ió cobalt en la fase líquida del ciment pot implicar la incorporació del ió en l'estructura cristal·lina del ciment, o per contra, el ió pot quedar adsorbit a la superfície dels cristalls. Els resultats obtinguts en aquest estudi apunten cap a la segona opció.

Per determinar l'efecte concret del dopatge amb cobalt sobre les propietats del ciment de fosfat de calci, es va realitzar una caracterització del ciment a nivell físic, químic i microestructural. Les tècniques de caracterització emprades en la caracterització físicoquímica i microestructural del material van ser la difracció de raigs X, l'espectroscòpia infraroja de reflectància total atenuada (ATR-IR), la microscòpia de rastreig (SEM), la picnometria d'heli i la determinació de la superfície específica mitjançant l'adsorció física de gas nitrogen. Així mateix, per determinar les propietats mecàniques es va realitzar un assaig a compressió uniaxial. Es va observar que la presència de ions cobalt no interfereix en el desenvolupament de la fase d'hidroxiapatita deficient en calci, però disminueix el grau de cristal·linitat del material. Tampoc van aparèixer canvis de morfologia en la microestructura dels ciments. En canvi, els temps de presa es van duplicar i la resistència a compressió va presentar una lleugera tendència a l'alça. Per últim, mitjançant un estudi d'alliberament de ions es va poder determinar la concentració de cobalt alliberada pels ciments durant una setmana i es va confirmar que aquesta quantitat era inferior al rang de concentracions de cobalt considerat tòxic.

1. Sumari

RESUM	1
1. SUMARI	3
2. INTRODUCCIÓ	7
2.1. Objectius del projecte.....	7
2.2. Abast del projecte	8
3. FONAMENTS TEÒRICS	9
3.1. L'os	9
3.1.1. Estructura i funció	9
3.1.2. Composició de l'os.....	12
3.1.3. Histologia òssia.....	12
3.1.4. Principis del procés de reparació de fractures òssies.....	14
3.2. Substituts ossis	19
3.2.1. Substituts ossis naturals	20
3.2.1.1. L'autoempelt o trasplantament autòleg	20
3.2.1.2. L'al·loempelt o trasplantament homòleg	20
3.2.1.3. Matriu òssia desmineralitzada.....	21
3.2.2. Substituts ossis sintètics	21
3.2.2.1. Substituts ossis de fosfat de calci	21
3.2.2.2. Vidres bioactius.....	22
3.2.3. Enginyeria de teixits	22
3.3. Biomaterials per a la reparació i la regeneració de teixit ossi.....	24
3.3.1. Fosfats de calci.....	24
3.3.2. Ciments de fosfats de calci.....	26
3.4. Estratègies per estimular l'angiogènesi i l'osteogènesi.....	29
4. MATERIALS I MÈTODES	35
4.1. Fase pols dels ciments.....	35
4.1.1. Preparació i síntesi	35

4.1.2.	Mòlta del fosfat tricàlcic α	38
4.1.3.	Additiu de la fase sòlida	39
4.2.	Fase líquida dels ciments	39
4.2.1.	Solució d'hidrogenfosfat de sodi	40
4.2.2.	Solució de sal de cobalt	40
4.3.	Mètode d'elaboració de mostres de CPC	41
4.3.1.	Nomenclatura i composició de les mostres	43
4.4.	Mètode d'obtenció de les mostres per realitzar l'estudi d'alliberament de ions	45
5.	TÈCNiques DE CARACTERITZACIÓ	47
5.1.	Caracterització física	47
5.1.1.	Temps de presa	47
5.1.2.	Picnometria d'heli	49
5.1.3.	Determinació de propietats mecàniques per assaig de resistència a compressió	51
5.2.	Caracterització química	52
5.2.1.	Identificació qualitativa de fases mitjançant difracció de raigs X	52
5.2.2.	Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier amb reflectància total atenuada (FTIR-ATR)	53
5.2.3.	Espectroscòpia per dispersió d'energia (EDS)	55
5.3.	Caracterització microestructural	56
5.3.1.	Mesura de la superfície específica mitjançant l'adsorció física de gas	56
5.3.2.	Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)	58
5.4.	Tècniques analítiques emprades en l'estudi d'alliberament de ions cobalt	59
5.4.1.	Colorimetria	59
5.4.2.	Plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS)	61
5.5.	Anàlisi estadística dels resultats	62
6.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	63
6.1.	Caracterització física	63
6.1.1.	Temps de presa	63
6.1.2.	Densitat esquelètica	64

6.1.3. Determinació de propietats mecàniques per assaig de resistència a compressió	65
6.2. Caracterització química.....	68
6.2.1. Identificació qualitativa de fases mitjançant difracció de raigs X.....	68
6.2.2. Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier amb reflectància total atenuada (FTIR-ATR).....	70
6.2.3. Espectroscòpia per dispersió d'energia (EDS)	72
6.3. Caracterització microestructural.....	73
6.3.1. Determinació de la superfície específica	73
6.3.2. Microestructura observada per microscòpia electrònica de rastreig.....	74
6.4. Estudi d'alliberament de ions cobalt	77
6.4.1. Per colorimetria.....	77
6.4.2. Per plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS)	79
7. CONCLUSIONS	83
8. PERSPECTIVES FUTURES	85
9. COSTS ECONÒMICS I IMPACTE MEDIAMBIENTAL	87
9.1. Costos econòmics.....	87
9.2. Impacte mediambiental i socioeconòmic del projecte	89
AGRAÏMENTS	91
BIBLIOGRAFIA	93
Referències bibliogràfiques	93

2. Introducció

Durant les últimes dècades, l'augment en l'edat mitjana de la població actual ha implicat l'aflorament d'una sèrie de trastorns ossis associats a l'envelliment de la població. Degut a aquesta situació, des de l'enginyeria de teixits i més concretament des del camp de la ciència dels biomaterials, s'han desenvolupat diferents ciments de fosfat calci per la substitució i regeneració òssia. Actualment, s'està desenvolupant l'anomenada tercera generació de biomaterials. La qual cosa significa que l'atenció dels estudis actuals es focalitza en el desenvolupament de materials per la regeneració de teixits des d'una estratègia el màxim de biomimètica possible.

2.1. Objectius del projecte

L'objectiu d'aquest projecte és obtenir ciments de fosfat de calci amb propietats angiogèniques per afavorir la regeneració de teixit ossi mitjançant la incorporació de cobalt a la fase líquida d'un ciment de fosfat de calci (CPC), basat en fosfat tricàlcic- α (α -TCP). La concentració de cobalt serà optimitzada per tal d'aconseguir els següents objectius:

- No interferir excessivament en la reacció de presa del ciment, ni en la transformació d' α -TCP a hidroxiapatita (HA).
- Mantenir o millorar les propietats mecàniques del material.
- Alliberar quantitats de cobalt prop de concentracions terapèuticament rellevants (100-200 μ M)

És important destacar que la principal restricció del projecte es troba en la quantitat màxima de cobalt que els ciments de fosfat de calci puguin alliberar. Una concentració massa elevada de cobalt alliberada a l'organisme és considerada perillosa, ja que el cobalt a elevades concentracions, provoca citotoxicitat. Per tant, s'ha de confirmar que la quantitat alliberada de cobalt pels ciments, no excedeix el rang de concentracions considerat terapèuticament rellevant.

2.2. Abast del projecte

Aquest projecte estableix la base per desenvolupar futurs estudis in vitro i in vivo per avaluar la resposta cel·lular a la implantació del ciment objecte d'estudi. El que seria la següent fase d'estudi, queda fora de l'abast del present projecte.

3. Fonaments teòrics

3.1. L'os

3.1.1. Estructura i funció

L'os és un teixit viu i dinàmic, està sotmès a constant remodelació i regeneració. En termes biològics, es descriu com a teixit connectiu. El teixit connectiu és el que uneix i actua com a suport de les diferents estructures de l'organisme.

Des d'un punt de vista macroscòpic, el teixit ossi és no homogeni, porós i anisotròpic. La porositat varia de forma contínua des d'un 5 a un 95%. A aquest nivell, l'os es classifica en compacte o cortical i esponjós o trabecular.

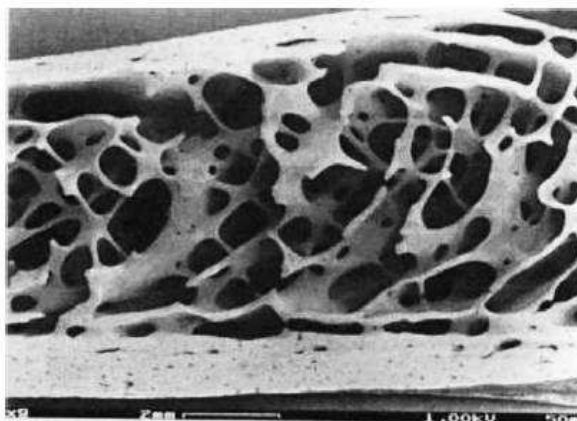


Fig. 3.1 Secció transversal d'un os, on s'observa os cortical i os trabecular [1]

L'os compacte o cortical (Fig. 3.2) es troba en la part externa de tots els ossos del cos actuant de protecció alhora que de suport, i presenta una estructura més densa que l'esponjós. Consta d'una porositat entre el 5 i 10%. Està format per anells concèntrics disposats de forma paral·lela entre ells, estenent-se al llarg de l'eix major de l'os, envoltant els anomenats canals de Havers ($50\mu\text{m}$ de diàmetre). Aquests serveixen de conducte per als vasos sanguinis, els vasos limfàtics i els nervis. Entre els anells concèntrics hi ha petits orificis on s'hi troben els osteòcits, cèl·lules que tenen per funció el intercanvi de nutrients. Cada un d'aquests sistemes cilíndrics que contenen els elements anteriorment mencionats i que formen l'os cortical s'anomena osteona.

L'os esponjós (Fig. 3.2) és menys dens. Presenta una porositat entre el 50 i 95%. Es troba normalment en els extrems dels ossos llargs, prop de les articulacions i a l'interior de les vèrtebres. L'os esponjós és altament vascular i freqüentment conté medul·la òssia vermella, on té lloc l'hematopoesi (la producció de cèl·lules sanguínies). La unitat primària anatòmica i funcional de l'os esponjós és la trabècula. Les trabècules són lamines d'uns 200 μm , disposades de forma irregular. Formen una estructura esponjosa i contenen osteòcits en el seu interior que intercanvien nutrients amb els vasos sanguinis [1].

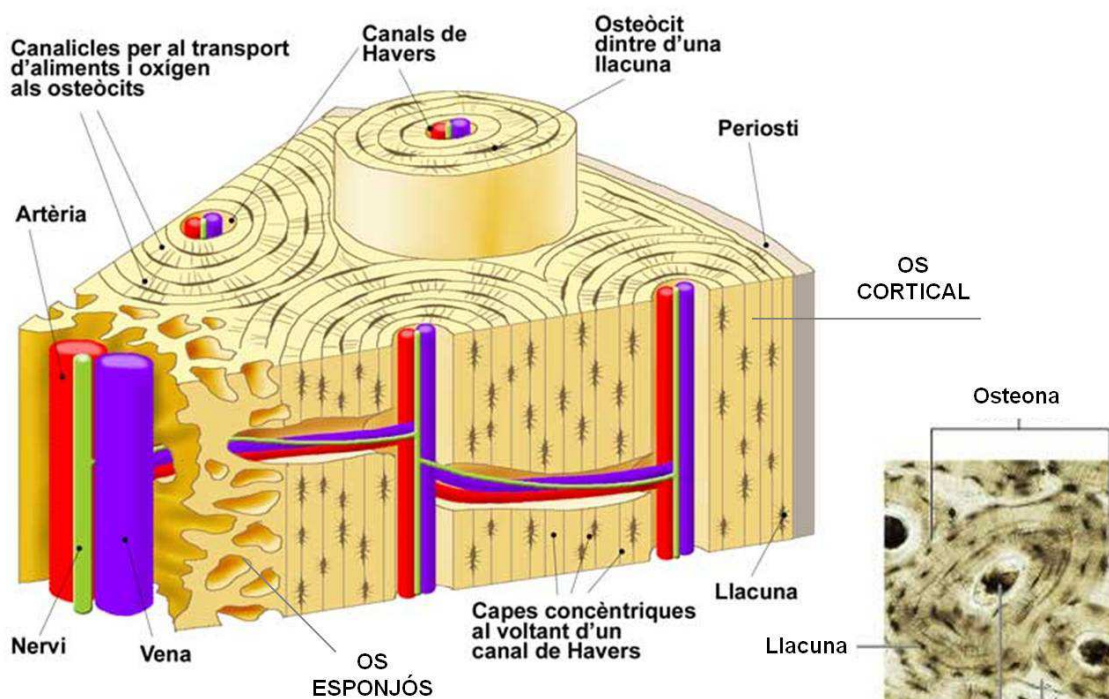


Fig. 3.2 Esbós 3D de l'estructura de l'os i micrografia del sistema Haversià (adaptat de [1])

L'os s'organitza estructuralment d'una manera jeràrquica (Fig. 3.3). Aquest fet li permet desenvolupar funcions molt diferents entre elles i és la causa del seu comportament mecànic anisotròpic.

Mentre que a nivell macroestructural es distingeix l'os esponjós i l'os cortical, a nivell microestructural (de 10 a 500 μm) es troben les estructures del sistema Haversià, les osteones i les trabècules. A nivell submicromètric (1-10 μm), es detecten les estructures lamel·lars. A nivell nanoestructural (des d'un centenar de nanòmetres a 1 μm), s'observa col·lagen fibril·lar i mineral incrustat. A nivell subnanoestructural (per sota del centenar de

nanòmetres), es troben elements constituents, com ara, cristalls d'HA, col·lagen i proteïnes no col·làgenes orgàniques.

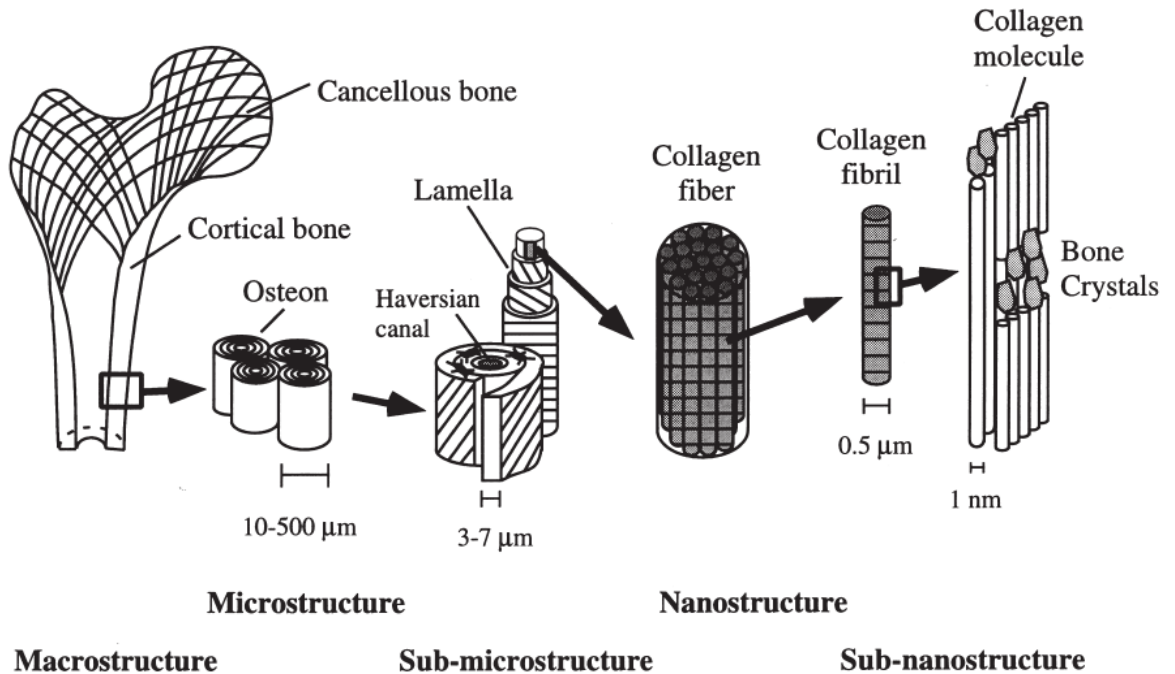


Fig. 3.3 Estructura jeràrquica de l'os, des del nivell macroscòpic al subnanomètric [2]

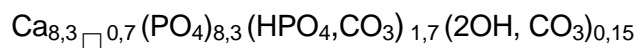
L'os desenvolupa diferents funcions fonamentals en l'organisme que es poden agrupar en funcions mecàniques, sintètiques i metabòliques:

- **Funcions mecàniques:** protegir els òrgans vitals, ajudar als músculs en la producció de moviment i sostenir la massa corporal.
- **Funcions sintètiques:** allotjar la medulla òssia que produeix glòbuls blancs i vermells.
- **Funcions metabòliques:** mantenir els nivells de minerals com el calci i el fòsfor. Emmagatzemar factors de creixement, com la proteïna morfogenètica òssia (BMP) i factors de creixement transformant (TGF). Emmagatzemar àcids grassos. Mantenir l'equilibri àcid-base. Funció de desintoxicació de la sang.

3.1.2. Composició de l'os

L'os és un material compost. La fase mineral constitueix el 60% del pes de l'os i es compon gairebé íntegrament d'hidroxiapatita (HA) deficient en calci carbonatada i petites quantitats de magnesi, sodi, potassi, fluorurs i clorurs. La matriu orgànica de l'os, que és el 30% del seu pes total, es compon principalment de col·lagen (90-95%) i 5-8% de proteïnes no col·làgenes com l'osteocalcina, osteonectina, proteoglicans, la proteïna morfogenètica òssia, proteolípids i fosfoproteïnes. El 10% restant s'atribueix a aigua.

L'hidroxiapatita precipita en els buits que deixen les fibres de col·lagen i presenta la següent fórmula:



On \square representa una vacant [3]

Les característiques principals de l'HA deficient en calci carbonatada són:

- és deficient en calci, per tant, la seva estructura cristal·lina presenta vacants, està distorsionada.
- presenta grups CO_3^{2-} en la seva estructura (substitució de grups PO_4^{3-})
- la seva composició no és estequiomètrica. Presenta una estructura molt oberta capaç d'acceptar altres espècies com ions: Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- o F^-
- és poc cristal·lina (250-500 x 30 Å)
- presenta una elevada superfície específica

3.1.3. Histologia òssia

Les cèl·lules òssies són les responsables de produir, mantenir i modificar l'estructura del teixit ossi. Formen una capa cel·lular contínua que cobreix totes les superfícies de la matriu extracel·lular. Es reconeixen quatre tipus de cèl·lules òssies: osteoblasts, cèl·lules de revestiment, osteoclasts i osteòcits (Fig. 3.4).

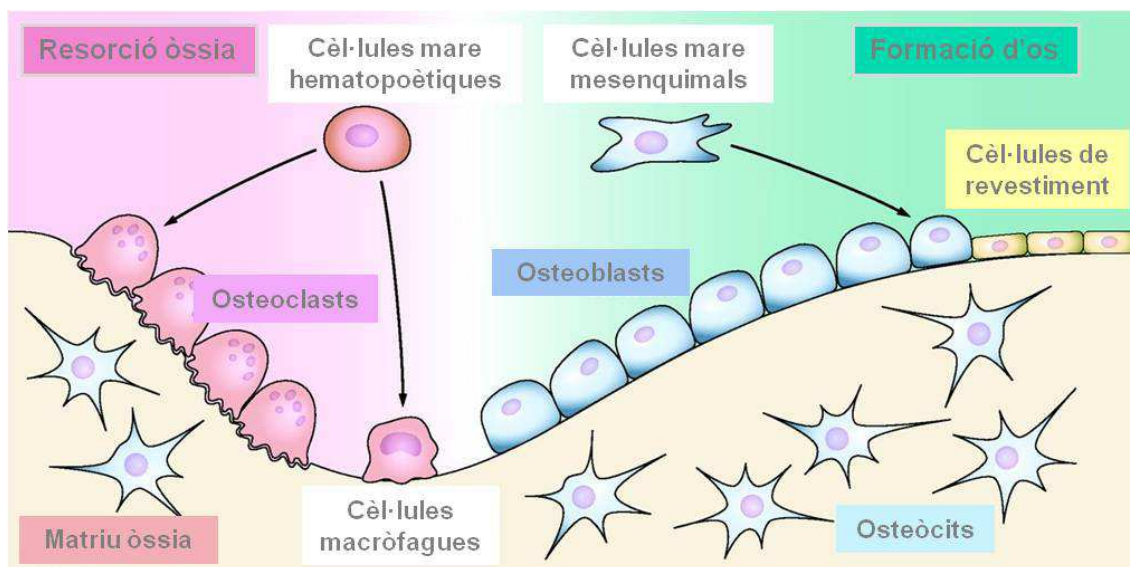


Fig. 3.4 Estructura cel·lular òssia. Quatre tipus principals de cèl·lules constitueixen el teixit ossi: osteoclasts, osteoblasts, osteòcits i cèl·lules de revestiment [4]

- **Osteoblasts:** es troben situats en totes les superfícies òssies on té lloc la formació activa d'os, ja sigui en les superfícies externes, on solen quedar recoberts per periosti, o bé en les superfícies internes o endòstiques. En el primer cas, els osteoblasts formen part de la capa més interna del periosti. En el segon cas, es troben entre la superfície òssia i elements del moll d'os o bé entre l'esmentada superfície i els canals vasculars. Funcionalment, no hi ha cap diferència entre els osteoblasts periòstics i els endòstics, però l'activitat dels primers dona lloc a canvis en la morfologia de l'os, mentre que la dels segons origina canvis en la densitat de la massa òssia.

Produeixen la matriu extracel·lular no calcificada i presenten la morfologia típica de les cèl·lules secretores de proteïnes. Els seus principals productes són les fibres de col·lagen tipus I (90% del total) i els components no col·làgens de la matriu com són els proteoglicans, fosfoproteïnes, glicoproteïnes i factors de creixement. Els osteoblasts són cèl·lules allargades, polaritzades, que segreguen matriu a nivell de la superfície apical. L'eix longitudinal d'un osteoblast s'orienta paral·lelament a la superfície òssia i a les fibres de col·lagen que ell mateix produeix. Els osteoblasts també participen en la primera fase de la reabsorció òssia.

- **Osteoclasts:** són els responsables de l'eliminació de teixit ossi un cop el procés ha estat iniciat pels osteoblasts. Són les cèl·lules que realitzen la reabsorció d'os. Des

del punt de vista funcional i de desenvolupament, són completament diferents de la resta de cèl·lules òssies. Els precursors dels osteoclasts són cèl·lules d'origen sanguini, de la línia hematopoètica. Aquestes cèl·lules es fusionen per donar lloc als osteoclasts, que contenen nombrosos lisosomes amb hidrolases àcides. No hi ha comunicacions directes entre els osteoclasts i les altres cèl·lules òssies. La comunicació és indirecta, mitjançant intermediaris químics.

- **Cèl·lules de revestiment:** són cèl·lules en repòs que es troben sobre les superfícies òssies inactives. En el cas de l'os adult, poden cobrir el 80% de les superfícies trabeculars i endocorticals. Són, de fet, una fase de diferenciació terminal dels osteoblasts. Són cèl·lules aplanades i amb pocs grànuls. Una fina capa de teixit connectiu no mineralitzat de 100-150 nm separa les cèl·lules de revestiment del límit mineralitzat de l'os. Les cèl·lules de revestiment no mostren normalment cap activitat mitòtica però, en ser estimulades, poden transformar-se de nou en osteoblasts.
- **Osteòcits:** són les úniques cèl·lules que es troben situades a l'interior de la matriu òssia mineralitzada. Representen un grup d'osteoblasts que ha patit una diferenciació terminal i ha quedat atrapat en la matriu que s'acaba de calcificar. Se situen en uns espais anomenats llacunes i mantenen comunicació amb altres cèl·lules a través dels canaliculs. Aquests es troben envoltats per un fluid ric en proteoglicans. [5]

3.1.4. Principis del procés de reparació de fractures òssies

L'os té la capacitat única entre teixits de guarir sense la formació d'una cicatriu fibrosa perquè diversos dels processos cel·lulars i moleculars que regulen la curació de l'os succeeixen mentre existeix desenvolupament esquelètic.

La curació d'una fractura òssia té com objectiu restaurar el teixit ossi a les seves propietats físiques i mecàniques originals. Aquest procés està influenciat per una varietat de factors metabòlics locals. És a dir, la curació adequada de l'os implica una complexa interacció entre cèl·lules i citocines que treballen en concert amb factors de creixement.

Les citocines són un conjunt de proteïnes que la seva funció immunoreguladora és clau en la resposta immunitària en la inflamació i en l'hematopoesi de diferents tipus cel·lulars. Els factors de creixement són una sèrie de proteïnes alliberades per plaquetes, macròfags i fibroblasts. Els factors de creixement també són de vital importància perquè apareixen en totes les fases de curació d'una fractura òssia. Aquestes proteïnes ajuden a vascularitzar i indueixen a les cèl·lules mesenquimals derivades, com ara monòcits i fibroblasts, a migrar, proliferar, i diferenciar-se en cèl·lules òssies (Fig. 3.5). Els principals factors de creixement que actuen sobre el teixit ossi són: les proteïnes morfogenètiques òssies (BMP), el factor de creixement transformant- β (TGF- β), el factor de creixement de fibroblasts (FGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i els factors de creixement similars a la insulina (IGF). Les més estudiades i conegudes d'aquestes proteïnes són les BMP, una família de glicoproteïnes derivades de la matriu òssia. Les proteïnes morfogenètiques òssies indueixen a les cèl·lules mesenquimàtiques a diferenciar-se en cèl·lules òssies. Actualment en l'enginyeria de teixit ossi, els factors de creixement representen un dels elements clau en combinació amb cèl·lules osteogèniques i bastides osteoconductives [6].

La reparació d'una fractura òssia es divideix convencionalment en quatre etapes,

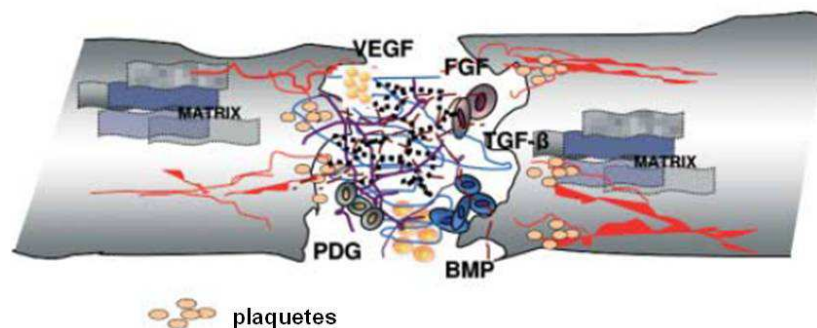


Fig. 3.5 Factors de creixement en les primeres fases de la reparació òssia [7]

cadascuna caracteritzada per un conjunt específic d'esdeveniments cel·lulars i moleculars [8]. Però a la pràctica, no hi ha una delimitació clara de tals esdeveniments; de fet, existeix un solapament entre les diferents etapes. Tot i així, el model de quatre etapes encara pot ser un sistema útil per a la descripció dels esdeveniments bàsics que tenen lloc (Fig. 3.6):

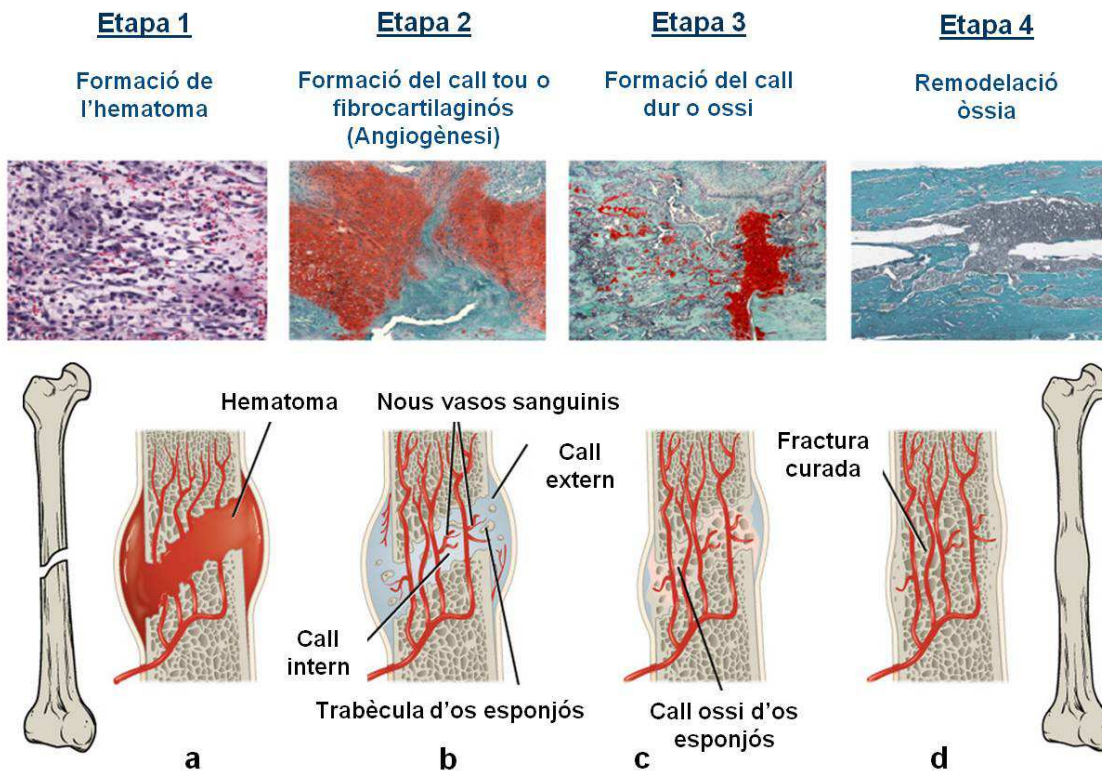


Fig. 3.6 Etapes de reparació de la fractura òssia. **a)** Formació de l'hematoma **b)** Formació del call tou o fibrocartilaginós: aquesta etapa inclou la formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi), un call extern i un intern **c)** Formació del call dur o ossi **d)** Remodelació òssia: el call és substituït per os lamel·lar i la vascularització torna al seu estat normal. [9-10]

Etapa 1, formació de l'hematoma: la fractura s'associa a una alteració de la integritat local del teixit, la interrupció de la funció vascular, i una distorsió de l'arquitectura òssia. Aquest dany condueix a l'activació de les vies no específiques de curació de ferides que acompanyen les lesions no esquelètiques. La extravasació (sagnat) en el lloc de la fractura està continguda pel teixit circumdant i es desenvolupa un hematoma. Plaquetes, macròfags i altres cèl·lules inflamatòries s'infiltra a l'hematoma, entre els fragments fracturats, per combatre la infecció. Secreten citocines i factors de creixement, i de la coagulació en resulta un trombe de fibrina.

Etapa 2, formació del call tou o fibrocartilaginós: aquesta etapa està controlada a nivell cel·lular per condrocits i fibroblasts. Aquestes cèl·lules produeixen un call tou semirígid que és capaç de proporcionar suport mecànic a la fractura. En aquest etapa també es produeix una invasió de cèl·lules endotelials vasculars per dur a terme el creixement de capil·lars

sanguinis (angiogènesi). L'angiogènesi és provocada per l'estimulació dels factors: VEGF, BMP, FGF-1 i TGF- β [9].

Etapa 3, formació del call dur o ossi: representa el període més actiu de l'osteogènesi. Es caracteritza per alts nivells d'activitat dels osteoblasts i la formació de matriu òssia mineralitzada, que sorgeix directament al call de manera perifèrica. El call tou insegur es va retirant gradualment a la vegada que apareix os nou i vascularització. L'os nou es coneix com call dur i és normalment molt irregular. Es sap que la vascularització és crítica per la formació del call dur, es necessita un augment en la pressió d'oxigen per tal que els osteoblasts s'hagin pogut diferenciar. A més, l'estimulació de la formació de vasos utilitzant factors angiogènics augmenta la formació del call dur i la curació de la fractura.

Etapa 4, remodelació òssia: l'etapa final de la reparació de fractures consisteix en la remodelació del teixit del call dur ossi en l'os cortical o trabecular original. El procés de remodelació és impulsat per un procés de resorció òssia seguida per la formació d'os lamel·lar. El procés de neovascularització es manté actiu. La remodelació de l'os es produeix lentament durant mesos o anys.

Un procés crític en la curació de l'os és l'aparició de vasos sanguinis en el call de fractura. L'angiogènesi, la formació de nous vasos sanguinis a partir dels preexistents, és estimulada després de la fractura per la producció local de nombrosos factors de creixement angiogènics. En el teixit ossi, els vasos sanguinis no només serveixen com a font d'oxigen i nutrients, sinó que també subministren calci i fosfats, base per a la mineralització. A més, els vasos sanguinis en la medulla òssia semblen tenir un paper important per a les cèl·lules mare formadores d'os esquelètic [11]. La connexió entre l'angiogènesi i l'osteogènesi és també evident durant la curació de fractures òssies, ja que una resposta angiogènica oportuna i coordinada és de vital importància per a una correcta reparació òssia. Una vascularització òssia inadequada està associada a la disminució de formació d'os i la disminució de massa òssia. D'aquí, se'n desprèn la idea que un dels requeriments d'un ciment de fosfat de calci per substitució òssia ha de ser: afavorir l'angiogènesi.

Amb la fractura existeix ruptura de vasos sanguinis, la qual cosa implica que el lloc de la fractura presenta condicions d'hipòxia (estat de deficiència d'oxigen). L'activació de la via de senyalització d'hipòxia estimula la producció de factors de creixement com el VEGF, per part de diversos tipus de cèl·lules presents en el lloc de fractura (Fig. 3.7). D'altra banda, la formació de vasos sanguinis dona suport a la invasió de cèl·lules inflamatòries, que

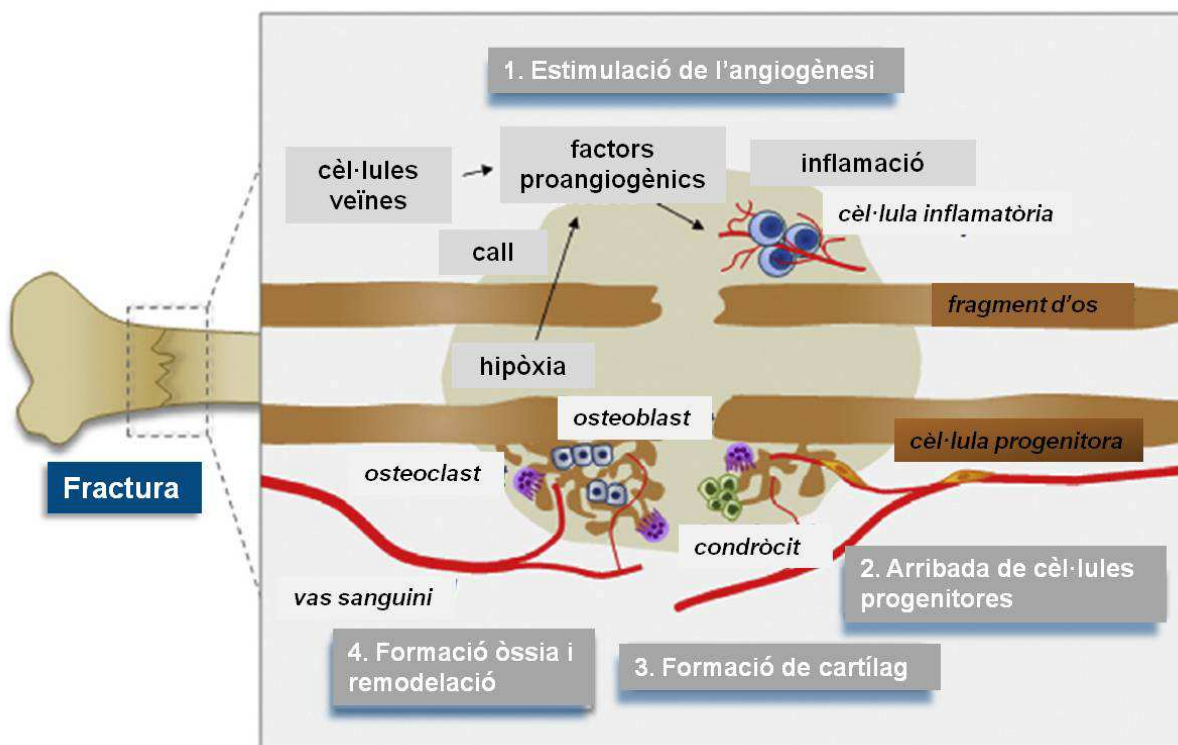


Fig. 3.7 Esquema de la resposta angiogènica durant la reparació d'una fractura òssia. [11]

contribueixen activament al procés de curació de la fractura i produeixen citocines proangiogèniques. Durant la formació del call tou i dur, el sistema vascular també intercedeix en la migració de cèl·lules progenitores al lloc de la fractura i promou la regeneració òssia mitjançant el subministrament d'oxigen, nutrients i els ions necessaris per a la mineralització.

Durant els últims anys, s'han descobert una gran quantitat de factors de creixement que estimulen l'angiogènesi i que també són importants durant el desenvolupament dels ossos i la curació normal de les fractures òssies. Alguns d'aquests factors que estimulen l'angiogènesi directament són: el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), el factor de creixement placentari (PIGF), el factor de creixement de fibroblasts (FGF) o membres de la família beta del factor de creixement transformant (TGF- β). Altres principalment regulen la producció de molècules angiogèniques; en són exemples: les proteïnes morfogenètiques de l'os (BMP), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i els membres de la família del factor de creixement similar a la insulina. Els factors més àmpliament estudiats i coneguts en relació a l'angiogènesi són: el VEGF, el PDGF i el FGF.

3.2. Substituts ossis

■ Característiques essencials d'un material per substituir i regenerar el teixit ossi:

Biocompatibilitat, osteogènesi, osteoinducció, osteoconducció i osteointegració són els quatre elements essencials requerits a un material per tal que existeixi regeneració òssia i una unió final entre l'os hoste i el material substitutori o d'empelt.

La **biocompatibilitat** pot ser la propietat del material substitutori més important. Es defineix en termes generals com la capacitat d'un material o dispositiu "per dur a terme la seva funció prevista, incloent un perfil de degradació apropiada, sense provocar cap efecte local o sistèmic indesitjat en l'hoste" [12]. Les respostes de l'hoste, tant positives com negatives, han d'incloure la resposta dels osteoclasts/osteoblasts, una inflamació prolongada, canvis microvasculars, l'encapsulació fibrosa, l'adsorció de proteïnes i la proliferació endotelial.

L'**osteogènesi** és l'estimulació i activació de les cèl·lules mare mesenquimals del teixit circumdant de l'hoste que es diferencien en osteoblasts. Aquest procés es dur a terme per una cascada de senyals i l'activació de diferents receptors intracel·lulars, dels quals, els més importants pertanyen a la família β -TGF.

L'**osteoinducció** ha estat definida de diferents maneres. Marshal Urist va ser un dels primers a descriure aquesta com "un procés que suporta la mitogènesi de les cèl·lules mesenquimals perivasculars indiferenciades que porten a la formació de cèl·lules osteoprogenitores amb la capacitat de formar os nou" [13]. El terme osteoinducció implica un mecanisme pel qual el teixit mesenquimàtic és induït a canviar la seva estructura cel·lular per esdevenir osteogènic, en altres paraules, per formar os.

L'**osteoconducció** és la capacitat de l'empelt per servir com a plantilla per a la formació d'os mitjançant el foment de les cèl·lules per adherir-se a la superfície, proliferar i produir os.

L'**osteointegració** descriu la unió superficial entre l'os i el material substitutori.

3.2.1. Substituts ossis naturals

L'empelt d'os és el segon trasplantament de teixit més comú, després del de sang. Generalment, un empelt ossi es requereix per estimular la curació òssia. A més, fusions espinals, omplir defectes després de l'eliminació de tumors ossis i diverses malalties congènites poden requerir empelts ossis. Diversos mètodes de reconstrucció de defectes ossis estan disponibles, els més habituals són: l'autoempelt o trasplantament autòleg, l'al·loempelt o trasplantament homòleg, la matriu òssia desmineralitzada (DBM) i empelts sintètics com els de fosfat de calci i vidres bioactius [14].

3.2.1.1. L'autoempelt o trasplantament autòleg

L'os autòleg, està considerat com l'estàndard d'or dins els empelts ossis, proporciona una osteoconductivitat i osteoinductivitat òptimes i bones propietats osteogèniques. Tot i així, pot fallar en la pràctica clínica per la mort cel·lular durant el trasplantament. Altres limitacions inclouen pacients d'edat avançada o pediàtrics i pacients amb malalties malignes. A més, l'autoempelt s'associa a un 8.5-20% de complicacions, incloent la formació d'hematomes, la pèrdua de sang, lesions del nervi, la formació d'hèrnia, infecció, lesió arterial, lesió ureteral, fractura, inestabilitat pèlvica, i de vegades, dolor crònic a la zona donant [15-16].

3.2.1.2. L'al·loempelt o trasplantament homòleg

En el 35% de tots els trasplantaments d'os s'utilitza teixit d'al·loempelt humà [17]. Els al·loempelts estan disponibles en diferents preparacions i formes, i el seu maneig és relativament fàcil. No obstant això, algunes consideracions de seguretat i biològiques s'han de tenir en compte, com ara la transmissió de malalties, la disminució de l'oferta, i un alt nivell de fracàs.

Els al·loempelts es poden aplicar com a estelles d'os, o com al·loempelts corticals estructurals, que poden ser vascularitzats o no vascularitzats. La incorporació depèn tant de les característiques de l'hoste com de les característiques de l'empelt. Les propietats dels al·loempelts estan influenciades per la seva preparació i la seva esterilització. El procés de

preparació de l'al·loempelt pot ser fresc-congelat, liofilitzat, o desmineralitzat. La resistència mecànica i la vascularització en els al·loempelts liofilitzats es redueixen significativament, però la congelació és insuficient per a l'esterilització, per tant, la irradiació es porta a terme sovint. Això afecta la immunogenicitat del material d'empelt, però també afecta a les propietats mecàniques i biològiques, el que porta a una reducció en els nivells d'una bona incorporació [18].

3.2.1.3. Matriu òssia desmineralitzada

La matriu òssia desmineralitzada és produïda a través de la descalcificació de l'os cortical. Llavors, es processa per tal de reduir el potencial d'infecció i la resposta immunogènica de l'hoste. El material produït, la DBM, conserva l'estructura col·làgena trabecular del teixit original i pot servir com una bastida osteoconductiva biològica malgrat la pèrdua de força estructural. No tots els resultats clínics són uniformement bons, degut en part als mètodes de processament no uniformes. D'aquí que la matriu òssia desmineralitzada s'utilitzi àmpliament com un " extensor de l'empelt d'os " enlloc de com un substitut ossi [18].

3.2.2. Substituts ossis sintètics

3.2.2.1. Substituts ossis de fosfat de calci

El substituts ossis de fosfat de calci (Ca-P), són similars en composició a la fase mineral de l'os natiu i consisteixen principalment en hidroxiapatita (HA), fosfat tricàlcic (TCP) o una barreja bifàsica de tots dos (BCP). Els substituts ossis de Ca-P estan disponibles com a grànuls, pastes i ciments. Les tècniques de fabricació proporcionen porositat i àrea de superfície específica que tenen efecte sobre el seu potencial biològic i curatiu.

Mentre que tots els substituts ossis de Ca-P són bioactius, biodegradables i osteoconductors, per si mateixos no són osteoinductius. A més, els substituts ossis de Ca-P són fràgils, posseeixen poca resistència a la tracció i ofereixen una integritat estructural limitada. Les seves propietats mecàniques es correlacionen estretament amb els percentatges de porositat i mida de porus. Està ben establert que la porositat és un factor essencial en la formació d'osteoides, però només quan la mida dels porus és superior a 100

μm [18]. La degradació dels substituïts ossis de Ca-P succeeix per la intervenció d'osteoclasts i els macròfags, o es produeix per dissolució in vivo. La cristal·linitat, la mida de partícula, l'àrea superficial, la porositat del material, així com l'entorn mecànic i biològic juguen un paper molt important en el procés de degradació.

3.2.2.2. Vidres bioactius

Els vidres bioactius estan compostos de calci, fòsfor, i diòxid de silici. Variant les proporcions d'òxid de sodi, òxid de calci i diòxid de silici, es poden produir tota gamma de formes, des de solubles a no absorbibles. Tots dos posseeixen propietats d'integració òssia i osteoconductives. Tenen significativament major resistència mecànica en comparació amb les bastides de fosfat de calci. Els blocs de vidres bioactius poden fracturar en el procés de conformació i perforació. Com a conseqüència d'això són difícils de fixar a l'esquelet però s'han utilitzat amb èxit com a expanders d'empelt ossi. Els vidres bioactius són fràgils i propensos a la fractura amb la càrrega cíclica. Per millorar la seva resistència a la fractura, s'empren mètodes com ara la incorporació de fibres d'acer inoxidable o la incorporació de partícules d'òxid de zirconi per augmentar la resistència a la flexió i la tenacitat.

3.2.3. Enginyeria de teixits

L'enginyeria de teixits és un camp multidisciplinari que engloba la química, la biologia, la medicina i la ciència dels materials, entre d'altres. Aquest camp multidisciplinari implica l'aplicació de principis i mètodes utilitzats en enginyeria, així com en ciències biològiques, per tal de comprendre la relació entre estructura i funció dels teixits i el desenvolupament de substituïts biològics que poden ser capaços de restablir, mantenir o millorar un teixit.

L'enginyeria de teixits se centra en la reparació o substitució de teixits mitjançant l'ús de biomaterials, les característiques dels quals han anat evolucionant des dels seus inicis en els anys 60 fins l'actualitat. En els anys 60 i 70 es va donar la primera generació de biomaterials. Durant aquest període l'objectiu era reemplaçar teixits mitjançant l'ús de materials inerts que generessin la mínima resposta possible per part de l'organisme [19]. En els anys 80, durant la segona generació de biomaterials va néixer el concepte de bioactivitat. L'objectiu era crear materials que presentessin característiques iguals a les del

teixit a reparar però que induïssin una resposta per part del teixit viu, per tal de promoure'n la regeneració. Actualment ens trobem en la tercera generació de biomaterials que combina la recerca de materials bioactius i alhora biodegradables [20]. Per tal de desenvolupar materials que tinguin capacitat per a estimular respostes biològiques per part del teixit a reparar, així com actuar de suports temporals s'utilitzen tres elements ja sigui de forma conjunta o separada: cèl·lules cultivades i/o modificades genèticament al laboratori, molècules que actuen com senyals químics per tal que les cèl·lules es reproduïxin o diferenciïn i substrats 3D que imiten l'estructura d'un òrgan o teixit amb l'objectiu de reemplaçar part d'un òrgan malmès que ha deixat de desenvolupar la seva funció.

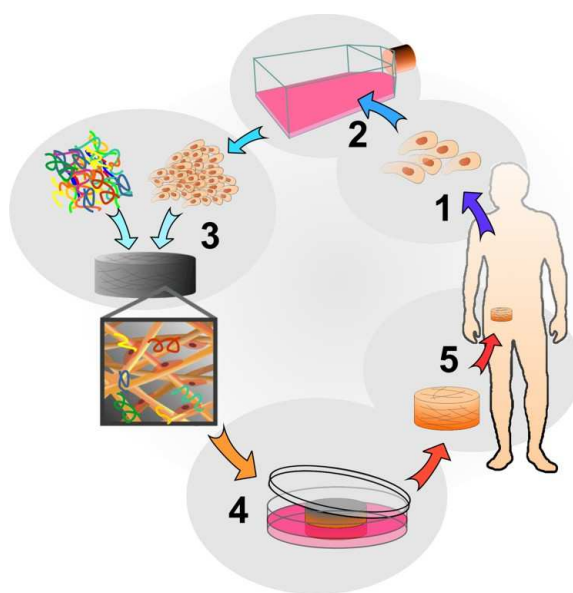


Fig. 3.8 Esquema dels principis de l'enginyeria de teixits. 1.Extracció de cèl·lules mare del pacient a través d'una biòpsia. 2.Expansió de cèl·lules in vitro. 3.Sembra de cèl·lules amb factors de creixement en una bastida. 4.Proliferació cel·lular i diferenciació ex vivo en un bioreactor per simular l'entorn fisiològic. 5.Implantació al pacient de la bastida amb cèl·lules [21]

3.3. Biomaterials per a la reparació i la regeneració de teixit ossi

3.3.1. Fosfats de calci

Els fosfats de calci (CaP) s'usen com a biomaterials en la reparació i regeneració de teixit ossi per la seva semblança amb la fase mineral de l'os i dents. Són bioactius, és a dir, que promouen la formació d'apatita biològica que interactua directament amb el teixit ossi a nivell atòmic. Això condueix a una unió fisicoquímica entre el implant i l'os, donant lloc a una bona osteointegració. A més, els fosfats de calci també són coneguts per ser osteoconductors, són capaços de proporcionar una plantilla per a la formació d'os nou i donar suport a l'adhesió i proliferació d'osteoblasts. D'altra banda, les principals limitacions per utilitzar fosfats de calci com a bioceràmiques portants de càrrega són les seves propietats mecàniques, són fràgils i presenten poca resistència a fatiga. Les aplicacions d'aquests materials són: l'ús en implants que no hagin de suportar càrrega, com a material de farciment en defectes ossis en cirurgia oral o ortopèdica i en forma de recobriments per a pròtesis metàl·liques [22].

Existeixen dos tipus principals de fosfats de calci: els obtinguts per precipitació d'una solució aquosa a temperatura ambient i els obtinguts per tractament tèrmic. En la taula adjunta (3.1), es mostren els principals fosfats de calci d'interès biològic. Els fosfats que s'obtenen per tractament tèrmic són el fosfat tetracàlcic, l'hidroxiapatita sinteritzada, el fosfat tricàlcic- α , el fosfat tricàlcic- β i el fosfat monocàlcic monohidratat, els altres fosfats que apareixen a la taula s'obtenen per precipitació a baixa temperatura.

El comportament dels fosfats de calci in vivo dependrà de la solubilitat d'aquests. En general, si un fosfat de calci és menys soluble que la fase mineral de l'os, trigarà un període de temps llarg a degradar. En canvi, si la solubilitat del fosfat és més gran que la de la fase mineral de l'os, es degradarà. Cal destacar que en viu, hi haurà també l'efecte de cèl·lules, com els osteoclasts, que contribueixen a la dissolució del fosfat.

Taula 3.1 Fosfats de calci d'interès biològic [22]

(*) indica que els fosfats de calci s'obtenen per sinterització a temperatures elevades

Nom	Fórmula	Ca/P	Símbol
Fosfat tetracàlcic	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^0$ (*)	2	TTCP
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (*)	1,67	HA
Hidroxiapatita precipitada	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,5-1,67	PHA
Hidroxiapatita deficient en calci	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1,5	CDHA
Fosfat de calci amorf	-----		ACP
Fosfat tricàlcic (α , β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (*)	1,5	TCP
Fosfat octacàlcic	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	OCP
Fosfat dicàlcic	CaHPO_4	1	DCP
Fosfat dicàlcic dihidratat	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	DCPD
Fosfat monocàlcic monohidratat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*)	0,5	MCPM

Per saber com es comportarà un fosfat de calci a una temperatura i pH determinat, es necessita llegir el diagrama de solubilitat per al sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ (Fig. 3.9). Com s'observa en el diagrama, per a un pH superior a 4.2 i a 37°C, el compost més estable és HA, i que per sota d'aquest pH, el compost més estable és DCP. També es pot veure, que a pH inferior a 8.5, el compost més soluble és TTCP, i a valors de pH superiors a 8.5, el compost més soluble és DCPD. Com a conclusió es pot afirmar que l'HA és el fosfat de

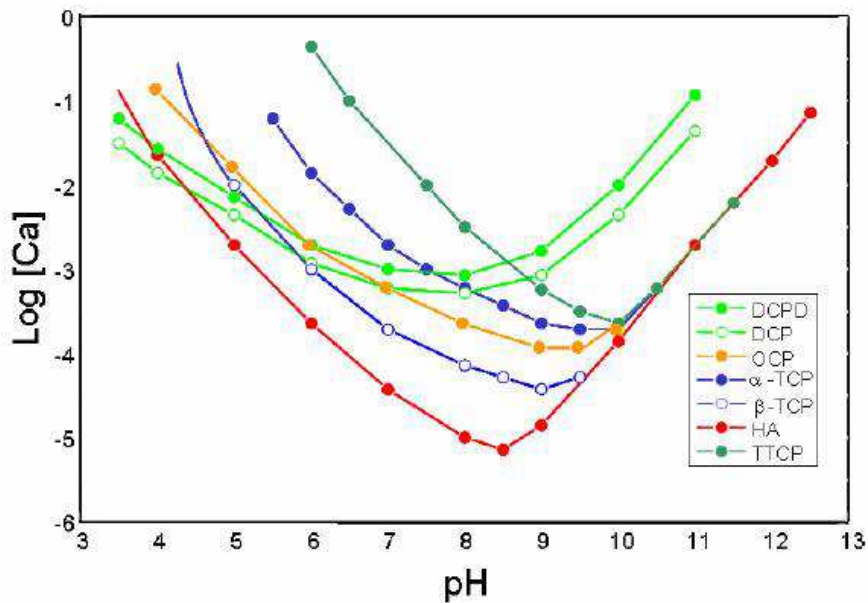


Fig. 3.9 Diagrama de solubilitat per al sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ [23]

calci més estable a pH neutre, ja que la seva solubilitat és inferior a qualsevol dels altres fosfats càlcics. Per tant, des d'un punt de vista termodinàmic, la dissolució de qualsevol fosfat càlcic a pH neutre, donarà lloc a la precipitació d'HA. Aquest és el fonament bàsic dels ciments de fosfat de calci. Aquests són capaços d'hidrolitzar-se i evolucionar cap a un sistema més estable, que seria l'HA, la fase mineral de l'os.

3.3.2. Ciments de fosfats de calci

Els ciments de fosfat de calci (CPC), s'obtenen a partir de la mescla d'una fase sòlida composta per un o varis fosfats de calci i una fase líquida formada per aigua o una dissolució aquosa.

A l'entrar en contacte les dues fases s'inicia la reacció de presa que, no tan sols implica canvis a nivell de composició química sinó que a més, implica canvis estructurals que es

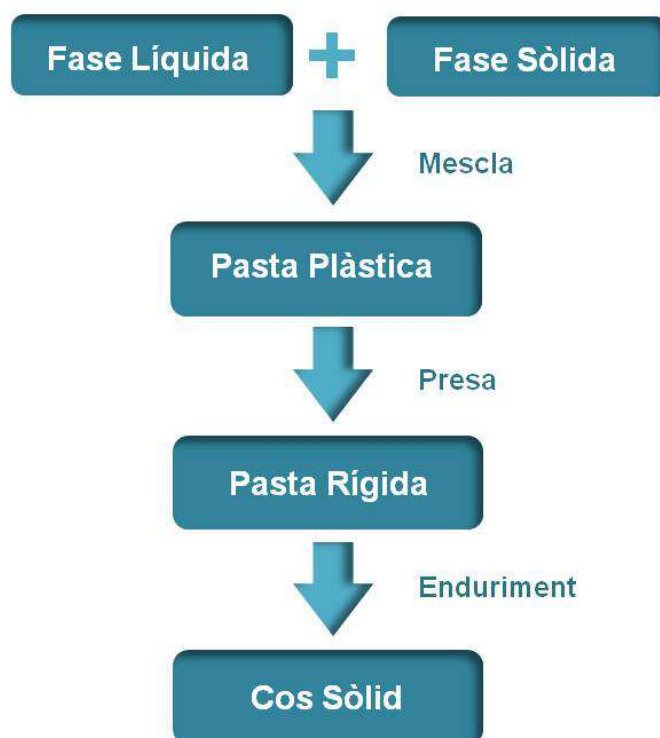


Fig. 3.10 Representació esquemàtica de l'obtenció d'un ciment

manifesten a mesura que avança la reacció, en una variació de la consistència de la pasta. Una vegada que la pasta de ciment aconsegueix certa consistència rígida, pot ser col·locada en un defecte ossi, com a substitut de la part danyada de l'os, on s'endurirà in situ. La quantitat de líquid i pols que es barreja, determina les propietats de la pasta de ciment, així com les propietats del cos sòlid final. Les fases de l'obtenció apareixen esquematitzades en la figura (Fig. 3.10).

Les propietats químiques i físiques d'un determinat CPC condicionaran la resposta cel·lular a la incorporació del ciment. Per exemple, propietats químiques com la càrrega superficial del ciment poden influir en fenòmens biològics com l'adsorció de proteïnes, que posteriorment condueixen a la diferenciació osteoblàstica, via interaccions de la matriu extracel·lular. De la mateixa manera, propietats físiques com ara la rugositat de la superfície també afecten la diferenciació cel·lular, influenciant l'adhesió cel·lular. Per tant, és crític caracteritzar un ciment de fosfat de calci per entendre la resposta cel·lular després de la seva implantació.

El concepte de ciments fosfat de calci apatítics va ser introduït per primera vegada per LeGeros el 1982, i la primera patent de ciments de fosfat de calci que prenen a temperatura ambient o temperatura fisiològica es va obtenir per Brown i Chow el 1986 [24]. Actualment, diversos CPC, amb diferents composicions de pols i components líquids estan disponibles al mercat, i molts més estan en fase experimental. La majoria dels CPC donen com a producte final HA o CDHA o bruxita, que són les fases més estables de l'ortofosfat de calci a $\text{pH} > 4,2$ i $\text{pH} < 4,2$ respectivament. Els ciments apatítics existents tenen una composició no estequiomètrica, coneguda com a hidroxiapatita deficient en calci (CDHA) $(\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x})$, on $1 < x < 0$. A diferència de la hidroxiapatita sinteritzada clàssica, que s'obté exclusivament a alta temperatura, aquests poden ser obtinguts a temperatura ambient o corporal, de forma mimètica a la hidroxiapatita fabricada pel cos humà [22].

La primera reacció que té lloc en qualsevol CPC és la dissolució inicial, que dependrà de la composició química i el pH de la solució com s'ha vist anteriorment. Els reactius dissolts formen un microambient sobresaturat. És la seva estabilitat relativa que conduirà a la formació d'un dels productes finals o l'altre. Així que, bàsicament, la barreja de pols seca amb una solució aquosa indueix diverses transformacions químiques, on els cristalls dels ortofosfats inicials de calci es dissolen ràpidament i precipiten en cristalls de CDHA o

DCPD. Durant la segona fase, que és la precipitació, els vidres acabats de formar creixen i formen una xarxa de microagulles o microplaques de productes finals. Aquest entrecreuament proporciona les propietats mecàniques. [3]

A diferència de les bioceràmiques de fosfat de calci que estan disponibles en grànuls o preformes sinteritzades, els ciments de fosfat de calci autofraguables tenen el gran avantatge de ser capaços d'adaptar-se fàcilment a la forma del defecte ossi, ràpidament integrar-se en l'estructura òssia i ser transformats per l'acció de les cèl·lules òssies responsables de la remodelació òssia local. A més d'aquesta propietat diferencial, els CPC presenten altres avantatges com ara:

- ▲ Tenen una biocompatibilitat i bioactivitat excel·lent
- ▲ Són osteoconductors
- ▲ Presenten porositat intrínseca, oberta i interconnectada
- ▲ Tenen fàcil preparació i maneig. També, fàcil emmotllament
- ▲ Són injectables, fet que permet la seva aplicació amb tècniques de cirurgia poc invasives i que el ciment s'adapti perfectament a la geometria del defecte.
- ▲ Són reabsorbibles, a diferència dels materials ceràmics tradicionals obtinguts per sinterització.
- ▲ Els seus components pols no són tòxics
- ▲ Són bons vehicles per a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs degut a la seva elevada superfície específica i el fet que la seva reacció de transformació no és exotèrmica.

Malgrat les nombroses característiques positives dels CPC que han estat citades, també presenten certes limitacions que calen esmentar:

- ▼ Presenten una dèbil resistència mecànica. La seva porositat intrínseca repercuteix sobre la seva resistència mecànica, i per tant, limita la seva aplicació quan es requereixen altes sol·licitacions mecàniques
- ▼ Tenen manca de macroporositat. Aquest fet dificulta la vascularització i una ràpida colonització del teixit ossi.
- ▼ La biodegradació in vivo pot ser més lenta que la velocitat de creixement d'os de nova formació

3.4. Estratègies per estimular l'angiogènesi i l'osteogènesi

Durant els últims anys l'ús de fosfats de calci per a procediments ortopèdics va marcar el canvi d'una era en l'enginyeria de teixits i la medicina regenerativa. La tecnologia es va desplaçar de la utilització d'autoempelts i al·loempelts a aplicacions de materials sintètics que oferien una alternativa que evitava les tècniques quirúrgiques addicionals o l'ús de material cadàver. Actualment, les tendències generals en materials sintètics per a substituïts ossis apunten cap a un nou canvi de paradigma. El nou model apunta a estendre les propietats osteoconductives d'aquests materials a propietats osteoinductives. Per a aquest propòsit s'ha de reconèixer i tenir present que la capacitat d'estimular l'osteogènesi va lligada a estimular l'angiogènesi, o la formació de vasos sanguinis. Els dos processos estan intrínsecament vinculats, ja que l'osteogènesi no seria possible sense l'angiogènesi.

Precisament una de les limitacions dels ciments de fosfat de calci és la incapacitat per proporcionar suficient subministrament de rec sanguini durant les primeres etapes de la regeneració òssia. La neovascularització d'un ciment implantat es produeix per la invasió de vasos sanguinis que es deriven de la vascularització circumdant del teixit hoste. No obstant això, la lentitud de la invasió de vasos sanguinis (<1 mm per dia) [25] fa que sigui un procés insuficient per a teixits de mida clínicament rellevant. Per superar aquest problema, s'han proposat dos mètodes per millorar la vascularització i la consegüent osteogènesi: el subministrament local de factors de creixement angiogènics i l'ús de cèl·lules endotelials combinades amb biomaterials com a matriu suport, per a dissenyar una xarxa vascular que permeti l'osteogènesi.

Dintre de l'estratègia d'addició d'un component biològic a un biomaterial per millorar l'angiogènesi i consegüent osteogènesi, en destaquen l'ús de factors de creixement angiogènics com ara les proteïnes morfogenètiques òssies (BMP's) i el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), entre d'altres.

Les proteïnes morfogenètiques òssies (BMP's) són una gran família on cada proteïna té un paper únic. Dintre d'aquestes en destaca la proteïna morfogenètica òssia-2 (BMP-2). A aquesta se li associa la conversió de cèl·lules mesenquimals a osteoblasts, la condrogènesi (desenvolupament de cartílag), també indueix al inici de la cascada de processos que tenen lloc durant la reparació de la fractura òssia i regula l'expressió d'altres BMP's [26]. Seguint aquesta estratègia s'han aconseguit molt bons resultats en moltes aplicacions, com en la

fusió espinal lumbar inferior i en aplicacions dentals [27,28], però en aplicacions de fusió cervical (superior) de la columna vertebral ha portat a qüestions preocupants respecte a seguretat i eficàcia [29-31]. Les principals complicacions es relacionen amb la formació d'os ectòpic (patologia que consisteix en formació d'os fora del teixit connectiu) i en certes situacions pot conduir a efectes secundaris molt greus.

Un altre factor de creixement de gran interès és el factor de creixement endotelial vascular (VEGF). Aquest és estimulador de la proliferació de cèl·lules endotelials i s'expressa durant la formació òssia endocondral (ossificació que reemplaça el cartílag). El VEGF també estimula la diferenciació a osteoblasts però només el BMP-2 està implicat directament en la diferenciació de cèl·lules mesenquimals a osteoblasts [10]. S'ha estudiat que la incorporació de VEGF millora la revascularització en models animals [32], però aquest enfocament té limitacions a causa de la inestabilitat de la proteïna in vivo i els possibles efectes secundaris no desitjats. De fet, es requereix una dosificació acurada del VEGF, ja que la sobreexpressió d'aquest factor de creixement angiogènic condueix a la formació d'os aberrant, fibrosi del moll d'os, vasos sanguinis anormals i hematopoesi extramedul·lar. Per tant, la dosificació dels factors de creixement angiogènics combinada amb biomaterials ha de ser estrictament regulada, ja que si existeix excessiva estimulació, apareixen efectes adversos molt greus.

D'altra banda, diversos grups estan explorant l'addició de cèl·lules endotelials autòlogues als implants d'enginyeria de teixits per tal d'accelerar l'establiment d'una xarxa vascular funcional, però existeixen diverses limitacions, com són: la poca disponibilitat i la baixa capacitat de proliferació d'aquestes cèl·lules. Tot i que aquesta estratègia té un potencial prometedor, actualment, es troba encara en fase experimental, i per tant, la implantació clínica és quasi bé inexistent [33].

Degut a les limitacions de seguretat i eficàcia d'aquestes dues estratègies i el seu elevat cost, s'ha buscat més enllà de l'addició de productes biològics i farmacològics als implants per regeneració òssia i s'ha investigat la incorporació de ions amb efectes terapèutics. Aquesta estratègia és potencialment més segura i consisteix en dopar bioceràmiques de fosfat de calci amb ions d'elements traça (Fig. 3.11). Es coneixen pel nom d'elements traça aquells elements que en petites quantitats, executen una varietat de funcions elementals dins la cèl·lula. Alguns elements traça són cofactors, ions inorgànics que han de ser presents perquè un enzim sigui actiu. D'altres són part de coenzims, molècules orgàniques

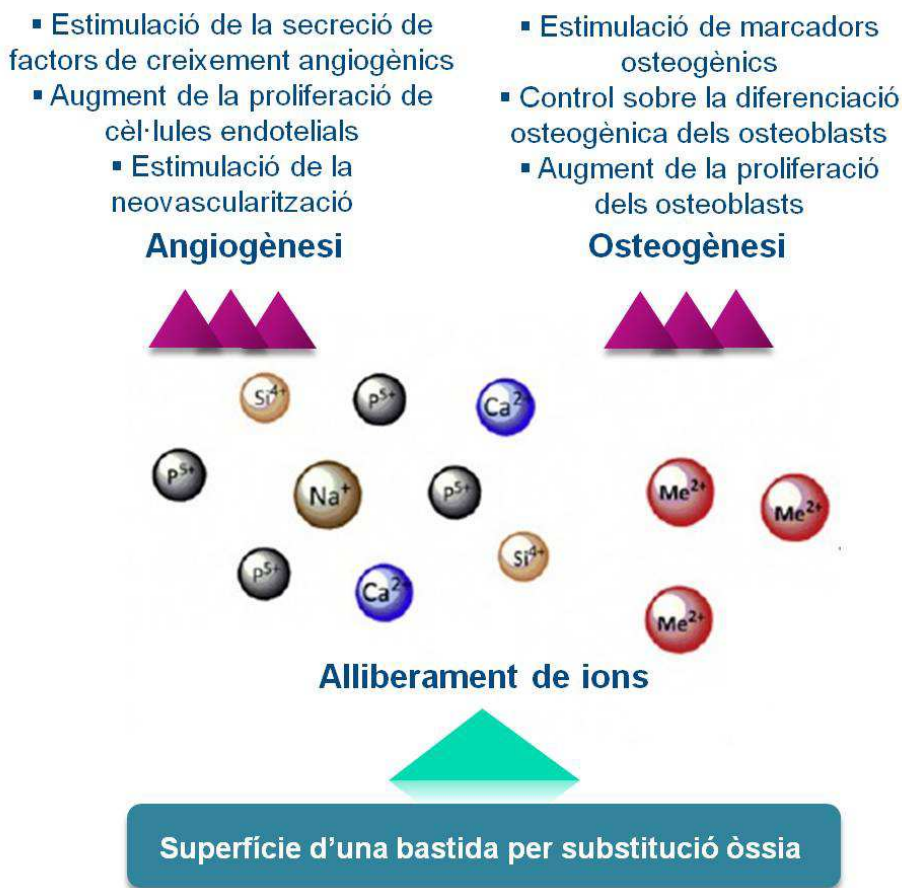


Fig. 3.11 Esquema de l'estratègia de dopatge de bioceràmiques de fosfat de calci amb ions d'elements traça per afavorir l'angiogènesi i l'osteogènesi [36]

que també han de ser presents perquè un enzim s'activi. Alguns exemples d'aquests elements són: ferro, potassi, magnesi, calci, coure...

Els ions d'elements traça juguen un paper molt important en el metabolisme del propi os. Per exemple, és conegut que el calci és un element clau en la remodelació òssia, perquè activa directament mecanismes intracel·lulars en els osteoblasts. El calci també augmenta l'expressió dels factors de creixement similars a l'insulina, els IGF, els quals regulen la proliferació d'osteoblasts. Altres elements traça com el Li^+ , Zn^{2+} , Sr^{2+} , $\text{Mn}^{2+/3+}$ i el Si^{4+} estimulen l'osteogènesi i elements com el Mg^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} afavoreixen l'angiogènesi i consegüentment l'osteogènesi [34-36]. Dintre d'aquest context, dopar fosfats de calci amb cobalt és d'interès perquè el cobalt que es pot alliberar d'aquests, pot tenir l'efecte d'agent angiogènic.

Diferents autors apunten que els ions cobalt indueixen hipòxia (baixa pressió d'oxigen) a nivell cel·lular, estabilitzant l'HIF-1 α , un factor de transcripció inductor de l'estat d'hipòxia

[37,38]. A través de la seqüència del factor de transcripció HIF-1 α , l'organisme respon a l'estat d'hipòxia expressant una sèrie de gens relacionats amb l'angiogènesi i la diferenciació de cèl·lules mare, i així s'accelera la regeneració òssia.

Els ions cobalt es troben presents a l'organisme com a cofactors de la vitamina B12. Per tant, es necessiten petites quantitats de cobalt per poder desenvolupar funcions biològiques normals. El nivell total de cobalt en el cos humà és d'uns 1,1 a 1,5 mg. El 14% de cobalt total s'emmagatzema a l'os, el 43% s'emmagatzema als músculs i la resta en els teixits tous [39]. Malgrat la presència de ions cobalt en el cos humà i el paper beneficiós que desenvolupen en el mecanisme de reparació de teixits, un excés de cobalt provoca dany oxidatiu per ROS (espècies reactives a l'oxigen) [40]. A més, una concentració elevada de ions Co²⁺ pot tenir reaccions adverses greus per als teixits, així com, una toxicitat sistèmica. Un altre fet a tenir en compte és que els ions Co²⁺ poden activar i augmentar la diferenciació de les cèl·lules de resorció osteoclàstica de l'os, provocant osteòlisis asèptica. En cas d'implant, això pot suposar un afluirament d'aquest [41]. Per aquests motius, diferents estudis han establert un rang de concentracions de ions cobalt de rellevància terapèutica (100-200 μ g o 6-12ppm), el límit del qual no s'ha de superar o es suscitaria perill de citotoxicitat [37,42].

Degut al coneixement dels ions cobalt com agent angiogènic, l'estratègia de dopar bioceràmiques amb aquest element, té un potencial prometedor en el camp de l'enginyeria de teixits i la medicina regenerativa per estimular la regeneració òssia. De fet, prèviament a aquest estudi, alguns autors han avaluat i estudiat l'addició de ions cobalt a diferents bioceràmiques com vidres bioactius o hidroxiapatites sintètiques. Wu et al. van recrear condicions d'hipòxia dopant bastides mesoporoses de vidres bioactius amb un 2 i 5% de cobalt [43]. En aquest estudi es va observar que l'addició d'un 2% de cobalt en les bastides augmentava l'expressió del HIF-1 α i la secreció de VEGF respecte les bastides sense cobalt. En canvi, es va demostrar que amb una concentració d'un 5% de cobalt no s'aconseguia la mateixa eficàcia. Hoppe et al. van reportar resultats similars a aquests quan van dopar bastides de vidres bioactius amb un 1 i 5% de cobalt [44]. Azevedo et al. van comprovar que només amb l'addició d'un 0.5% de cobalt a vidres bioactius, s'incrementava al doble l'expressió del HIF-1 α . En el mateix estudi es va observar que dopant les bastides amb un 4% de cobalt, la quantitat de ions alliberada a l'organisme provocava citotoxicitat [45]. Recentment, Kulanthaivel et al. han dopat hidroxiapatita sintètica amb ions magnesi i cobalt al 5% amb resultats satisfactoris [46]. Encara que fins ara el nombre d'estudis és

reduït, els resultats indiquen que l'estratègia de dopar biomaterials amb ions cobalt és una estratègia interessant per a aplicacions en enginyeria de teixit ossi.

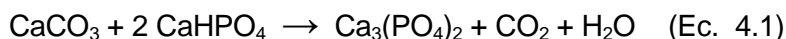
4. Materials i mètodes

En aquest treball es van preparar diferents ciments de fosfat de calci (CPC) dopats amb cobalt. La fase sòlida d'aquests ciments consisteix en una mescla formada majoritàriament per pols de fosfat tricàlcic α (α -TCP) i una petita part d'hidroxiapatita precipitada (PHA). Com a fase líquida dels ciments s'utilitzen dissolucions aquoses de sal de cobalt (CoCl_2) a diferents concentracions i dissolucions aquoses al 2,5% en pes d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) amb diferents continguts de sal de cobalt. A continuació, s'explica quin és el procés d'obtenció de la fase sòlida, així com de la fase líquida dels ciments.

4.1. Fase pols dels ciments

4.1.1. Preparació i síntesi

La fase pols dels ciments de fosfat de calci es va obtenir per sinterització d'una mescla estequiomètrica de carbonat de calci (CaCO_3) i hidrogenfosfat de calci (CaHPO_4), segons la reacció en estat sòlid:



D'acord amb l'estequiometria de la reacció, per a obtenir 150g de fosfat tricàlcic es van mesclar 48,399g de carbonat de calci (CaCO_3 , Sigma-Aldrich C4830) amb 131,589g d'hidrogenfosfat de calci (CaHPO_4 , Sigma-Aldrich C7263). Per poder assegurar l'homogeneïtat de la mescla, totes dues pols es van mesclar en sec durant 15 minuts a 1425 rpm en un mesclador automàtic (Whip Mix). A continuació, la mescla homogènia es va introduir en un gresol de platí-rodí i es va col·locar al forn (Obersal CNR-58) per poder realitzar un tractament tèrmic. L'objectiu final d'aquest tractament tèrmic és aconseguir fosfat tricàlcic de fase α . Cal esmentar que el fosfat tricàlcic té tres fases al·lotròpiques: α' , α i β . La fase β és estable des de valors de temperatura ambient fins als 1180°C i presenta una estructura hexagonal, mentre que la fase α que ens interessa, és estable a temperatures superiors a 1180°C i té estructura monoclínic.

El tractament tèrmic, com s'observa en la Fig. 4.1, consta de tres rampes d'escalfament, tres etapes a temperatura constant i una última etapa de refredament que consisteix en un tremp a l'aire per evitar la reversió de la fase α a β .

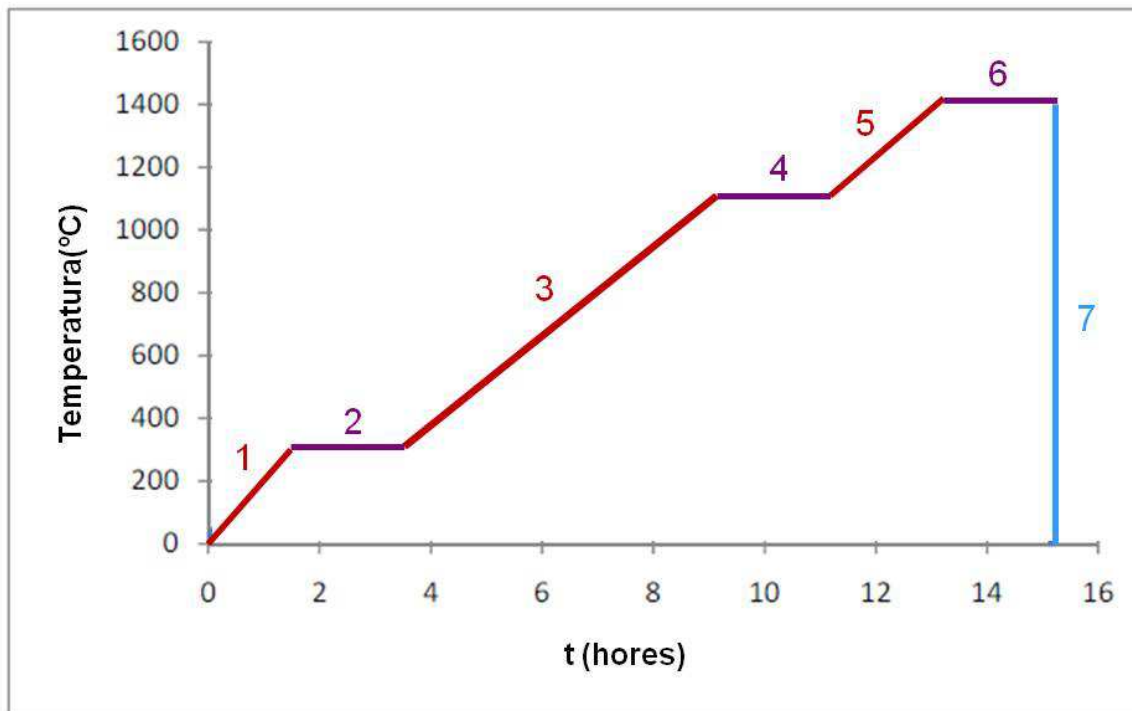


Fig. 4.1 Esquema de les etapes del tractament tèrmic per l'obtenció de la pols d' α -TCP

Les especificacions de cada etapa del procés de sinterització dut a terme són les següents:

- Etapa 1: escalfament fins a 300°C durant 1.45 hores a una velocitat d'escalfament de 2.5°C/min
- Etapa 2: eliminació d'aigua i diòxid de carboni a 300°C durant dues hores.
- Etapa 3: escalfament fins a 1100°C durant 5 hores a una velocitat d'escalfament de 2.5°C/min
- Etapa 4: estabilització durant dues hores a 1100°C per permetre la transformació de la fase β a la fase α
- Etapa 5: escalfament fins a 1400°C durant dues hores a una velocitat d'escalfament de 2.5°C/min
- Etapa 6: estabilització a 1400°C durant dues hores. Aquesta etapa té com a objectiu la total transformació a α -TCP.
- Etapa 7: tremp a l'aire per tal de retenir la fase α a baixa temperatura.

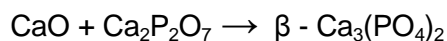
Durant l'escalfament inicial fins 300°C s'elimina l'aigua que apareix com a producte de la descomposició de dues molècules d'hidrogenfosfat de calci (monetita) en pirofosfat de calci:

$$2\text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$$

De 300°C a 1100°C es produeix la descomposició del carbonat de calci a òxid de calci i diòxid de carboni:

$$\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$$

Durant l'etapa 4, a 1100°C es produeix la reacció en estat sòlid:



A 1180°C es produeix la transformació al·lotròpica de β a α i es continua l'escalfament fins 1400°C per assegurar-se d'una conversió de fase completa. Fer un escalfament fins 1400°C permet treure el gresol del forn i realitzar un tremp a l'aire sense que la fase α reverteixi a la fase metaestable β . Un cop es va retirar el gresol del forn es va procedir a realitzar el tremp a l'aire amb l'ajuda d'un ventilador. També es va esmicolar la mostra amb un martell per facilitar el refredament del material a la màxima velocitat possible, i així retenir la fase α del TCP.



Fig. 4.2 Tremp a l'aire d' α -TCP

Per a la realització d'aquest projecte es van sinteritzar quatre lots de 150g de fosfat tricàlcic α seguint el mateix procediment descrit anteriorment.

4.1.2. Mòlta del fosfat tricàlcic α

La mòlta de les escames d' α -TCP obtingudes després del tremp és una etapa important en el procés de fabricació del ciment de fosfat de calci, ja que determinarà la mida de partícula de la fase sòlida del ciment. La mida de partícula és una variable que afecta a la cinètica de reacció de fraguat del ciment de fosfat de calci, condiona les seves característiques micro i nanoestructurals i les conseqüents propietats mecàniques [47]. Per tant, és necessari fixar aquesta variable en el procés de mòlta mitjançant un protocol per poder tenir la mateixa distribució de mida de partícula en tots els lots de pols de ciment preparats durant el projecte.

Un protocol de mòlta consta dels següents paràmetres:

1. El temps de mòlta. En general, aquest paràmetre afecta significativament el nivell d'afinament de la pols.
2. La velocitat de rotació del molí. A més velocitat, més efectiva serà la fragmentació de les partícules.
3. El material, número i dimensions de les boles a utilitzar. Per exemple, si els fragments de material a moldre són grans, serà necessari una primera etapa de mòlta amb boles grans per esmicolar al màxim els fragments i una segona mòlta amb boles més petites per l'afinament de la pols.



Fig. 4.3 Partícules d' α -TCP abans i després de la mòlta segons el protocol 15:450

El protocol de mòlta amb el qual es va treballar durant el projecte fou el 15:450. La mida mitjana de partícula que s'aconsegueix és aproximadament de $5,56\mu\text{m}$. Aquest protocol



consta d'un temps de mòlta curt de 15 minuts a una velocitat de rotació de 450 rpm. Es van utilitzar 10 boles grans d'àgata (99.9% SiO_2) de 30mm de diàmetre que tenen bona resistència a l'abrasió i permeten treballar amb materials de duresa elevada. Aquestes boles s'introdueixen en un recipient d'àgata de capacitat 500ml i a sobre d'elles, per optimitzar la mòlta, s'hi afegeix 145g d' α -TCP (Fig. 4.3). El recipient es tanca i segella, i es col·loca en un molí planetari (model Pulverisette 6, Fritsch GmbH) (Fig. 4.4).

Fig. 4.4 Molí planetari

4.1.3. Additiu de la fase sòlida

Per facilitar la reacció de presa del ciment s'afegeix un 2% en pes d'hidroxiapatita precipitada (PHA, Merck ref.1.02143.1000) al fosfat tricàlcic α sinteritzat i mòlt. Les partícules d'hidroxiapatita precipitada actuen com a germen o llavor per la cristallització de la fase producte de la reacció, la hidroxiapatita deficient en calci (CDHA). És a dir, les partícules d'HA precipitada tenen l'efecte d'afavorir el procés de nucleació heterògena.

Per aquest motiu, a cada lot de 145g d' α -TCP pols es van afegir 2.9g de PHA. A continuació, per homogeneïtzar el conjunt de les dues pols, aquestes es mesclen en sec durant 15 minuts a 1425 rpm en un mesclador automàtic (Whip Mix). Finalment, la pols de ciment obtinguda s'introdueix dins de recipients de plàstic tancats hermèticament i s'emmagatzemen en un dessecador a temperatura ambient.

4.2. Fase líquida dels ciments

En el cas dels dos ciments control la fase líquida consisteix en una dissolució aquosa al 2.5% en pes d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) en un, i aigua destil·lada en l'altre. Per a la resta de ciments s'empren dissolucions aquoses de sal de cobalt (CoCl_2) i dissolucions

aquoses al 2,5% en pes d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) amb diferents continguts de sal de cobalt (CoCl_2).

4.2.1. Solució d'hidrogenfosfat de sodi

La dissolució d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) actua com accelerant de la reacció de presa del ciment. Per a la preparació de la dissolució al 2.5% en pes es dissolen 2.5 g de Na_2HPO_4 (Merck, ref.1.06586.0500) en 100ml d'aigua destil·lada amb l'ajuda d'un agitador magnètic i posteriorment, la dissolució obtinguda es conserva a temperatura ambient.

4.2.2. Solució de sal de cobalt

Es van preparar dues sèries de tres dissolucions diferents de sal de cobalt cadascuna. Cal esmentar que es va treballar amb baixes concentracions de cobalt per evitar problemes de possible toxicitat.

La primera sèrie estava formada per tres dissolucions aquoses al 2,5% en pes d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) amb continguts de cobalt de 0.1%, 0.5% i 1% en pes. Per obtenir-les es van dissoldre respectivament: 0.044g, 0.22g i 0.44g de CoCl_2 (Sigma Aldrich C8661) en 20ml de dissolució aquosa d'hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4) al 2.5% en pes amb l'ajuda d'un agitador magnètic.

Es va observar que al afegir sal de cobalt a la dissolució accelerant es formaven immediatament precipitats d'un compost de coordinació entre els ions hidrogenfosfat i els ions cobalt. Encara que es va procedir a allargar el temps d'agitació, els precipitats del complex no van desaparèixer. Aquests precipitats es poden detectar a simple vista com s'aprecia en les imatges Fig. 4.5 i Fig. 4.6

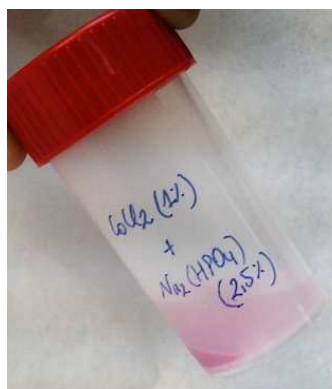
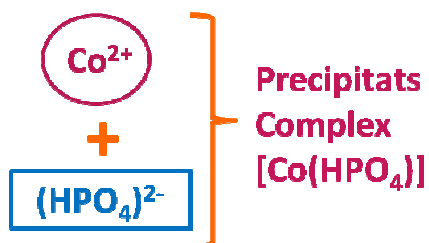


Fig. 4.5 Precipitats que apareixen en la primera sèrie de dissolucions

Per evitar l'aparició de precipitats en les dissolucions que es convertiran en la fase líquida del ciment, es va procedir a preparar una segona sèrie de tres dissolucions aquoses de CoCl_2 , sense presència d'hidrogenfosfat de sodi. Aquestes tres dissolucions contenen un 0.1%, 0.5% i 1% en pes de cobalt cadascuna. Per obtenir-les es van dissoldre respectivament: 0.044g, 0.22g i 0.44g de CoCl_2 en 20ml d'aigua destil·lada amb l'ajuda d'un agitador magnètic.



Fig. 4.6 Dissolució aquosa a l'1% en pes de Co i dissolució a l'1% en pes de Co amb accelerant.

A continuació, l'estoc de les sis dissolucions es va emmagatzemar a temperatura ambient.

4.3. Mètode d'elaboració de mostres de CPC

El procés d'obtenció de provetes de ciment de fosfat de calci s'inicia amb la barreja de la fase líquida amb la fase sòlida del ciment. La quantitat de pols necessària per volum de líquid en la mescla de fases ve definida per la relació líquid/pols (L/P). Aquest factor influeix directament sobre la plasticitat inicial de la pasta de ciment, la cohesió, el temps de presa, la injectabilitat i la resistència mecànica del material. Per totes les mostres preparades en el projecte el valor de la relació líquid/pols es va mantenir constant a 0.35 ml/g. És a dir, per cada mil·lilitre de líquid es van afegir 2.857g de pols α -TCP.

Els passos següents per obtenir les bastides de ciment són reproduïbles i segueixen el següent protocol:

- Addició d'un mil·lilitre de fase líquida en un morter de vidre de 30ml de capacitat.

- Afegir 2.857g de pols α -TCP al morter i barrejar amb una espàtula íntimament durant menys d'un minut fins aconseguir una pasta homogènia.
- Transferir ràpidament la pasta de ciment a motlles de tefló de dotze cavitats cilíndriques, ja que la reacció de presa del ciment comença en el moment de mesclar les fases. Les dimensions de les cavitats del motlle són 6mm de diàmetre i 12mm d'altura.

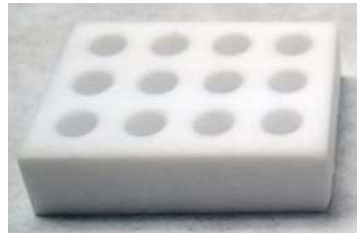


Fig. 4.7 Motlle de tefló per conformar les provetes de ciment

- Els motlles plens es deixen reposar una nit a 37°C i atmosfera saturada, per cohesionar les mostres.
- Els motlles es submergeixen en aigua destil·lada dintre de pots de polipropilè tancats hermèticament i s'emmagatzemen en una estufa a 37°C durant onze dies. Durant aquest període de temps, el ciment acaba de prendre i s'endureix.
- Als onze dies, els motlles s'extreuen dels pots i es poleixen els plans basals dels motlles amb paper esmerilat, número P1200. Aquest pas s'efectua per eliminar les possibles rebaves de cada peça cilíndrica. L'objectiu és garantir que cada peça després del desemmotllament tingui unes superfícies basals el màxim de planes i paral·leles entre sí.
- Per desemmotllar les mostres s'utilitza un dispositiu format per una vareta roscada i una peça de forat roscat fixa. Una imatge d'aquest instrument s'observa en la Fig. 4.8. Al fer girar el cap de la vareta, aquesta es desplaça en sentit longitudinal de l'eix i empeny la mostra de ciment fora de la cavitat del motlle.
- L'asseccament de les mostres consisteix en un bany d'acetona i el període d'una nit a l'estufa a 120°C

- Les mostres es conserven a dintre d'un pot de polipropilè tancat i s'emmagatzemen al dessecador.

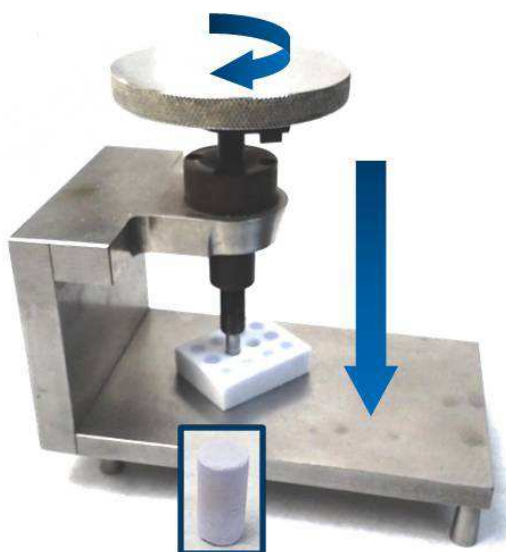


Fig. 4.8 Instrument utilitzat en el desemmotllament de les mostres

4.3.1. Nomenclatura i composició de les mostres

Es van preparar dos grups de mostres que difereixen en l'addició i no addició de l'espècie accelerant, Na_2HPO_4 . A cada grup li corresponen quatre tipus diferents de mostres que difereixen entre sí en el contingut de cobalt en la composició de la fase líquida del ciment. Per cada tipus de mostra es van elaborar dotze provetes, per tant, un total de 96 provetes.

Les variables d'estudi són dues: el contingut de cobalt en la fase líquida del ciment i l'addició o absència d'agent accelerant en la fase líquida.

Com s'ha esmentat anteriorment, la relació líquid/pols es manté constant a 0.35ml/g per totes les mostres. Al igual que la composició de la fase sòlida, pols α -TCP amb 2% de PHA, i la mida de partícula de la fase pols. Aquesta última ve determinada pel protocol de mòlta "15:450" i no es varia en tot el treball.

D'ara en endavant, les mostres es designaran per un codi que expressa el contingut de cobalt en pes de la fase líquida (Co-0.1, Co-0.5, Co-1.0) i la presència o absència d'accelerant respectivament (---A , ---∅)

Els tipus de mostres dels dos grups apareixen llistades amb el seu codi i la composició de la seva fase líquida en la següent taula:

Taula 4.1 Nomenclatura de les mostres estudiades i composició de la seva fase líquida. Les dues variables són l'addició d'agent accelerant i el contingut de cobalt

CODI	COMPOSICIÓ DE LA FASE LÍQUIDA
CTRL A	Agent accelerant (dissolució aquosa de Na_2HPO_4 al 2.5% en pes)
Co-0.1 A	Dissolució aquosa de CoCl_2 al 0.1% en pes + Agent accelerant
Co-0.5 A	Dissolució aquosa de CoCl_2 al 0.5% en pes + Agent accelerant
Co-1.0 A	Dissolució aquosa de CoCl_2 a l'1.0% en pes + Agent accelerant
CTRL	Aigua destil·lada
Co-0.1	Dissolució aquosa de CoCl_2 al 0.1% en pes
Co-0.5	Dissolució aquosa de CoCl_2 al 0.5% en pes
Co-1.0	Dissolució aquosa de CoCl_2 a l'1.0% en pes



Fig. 4.9 Provetes assecades i ordenades per tipus de mostra. Les mostres al 0.1%, 0.5% i 1% en pes de cobalt presenten una seqüència gradual de color

4.4. Mètode d'obtenció de les mostres per realitzar l'estudi d'alliberament de ions

Es va realitzar un estudi d'alliberament de ions cobalt responent a la necessitat d'esbrinar la viabilitat dels ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt com a material biocompatible i estimulador de la regeneració òssia. S'ha de tenir en compte que un nivell massa elevat en les concentracions de cobalt alliberat implicaria possibles problemes de toxicitat i la funció d'estimulació en l'etapa de vascularització es veuria frustrada.

El protocol que es va seguir en aquest estudi per preparar les mostres és el següent:

- Es va preparar pasta de ciment de composició: CTRL, Co-0.1, Co-0.5, Co-1.0, CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A i Co-1.0 A. Els passos seguits en l'elaboració de la pasta de ciment són anàlegs als de la preparació de la pasta per les provetes cilíndriques, però en aquest cas, la pasta es va emmotllar en motlles de tefló de cavitats cilíndriques de 15mm de diàmetre i 2.5mm d'alçada. El resultat fou l'emmotllament de 24 discs de ciment, tres discs per cadascuna de les vuit composicions diferents.



Fig. 4.10 Motlle de tefló de fàcil obertura amb cavitats cilíndriques ($\varnothing=15\text{mm}$ i $h=2.5\text{mm}$)

- Ràpidament els motlles plens es van guardar durant dues hores en atmosfera 100% humida a temperatura 37°C , per tal que els discs guanyessin cohesió. Es va observar que si el temps de cohesió era inferior a dues hores, les mostres Co-0.5 i Co-1.0 al submergir-les, sofrien descohesió.
- Es van desemmotllar els 24 discs i seguidament se'n va mesurar el pes de cadascun.

- En una placa de cultiu cel·lular estèril de poliestirè s'hi van ficar 2ml d'aigua destil·lada a 37°C, a cadascun dels 24 pouets. A continuació, s'hi van submergir els 24 discs de ciment, un a un amb molta cura, i vigilant que no hi hagués descohesió en cap mostra. Els pouets es van cobrir amb una làmina de parafilm per segellar-los i evitar l'evaporació d'aigua. Tot seguit, es va tancar la placa de cultiu cel·lular amb la seva tapa, es van segellar les juntes d'aquesta amb parafilm i es va guardar a l'estufa a 37°C.



Fig. 4.11 Discs de ciment submergits en aigua (3 discs per cadascun dels 8 tipus de mostra)

- A les 24h es va procedir a extreure l'aigua dels pouets. Es van mesurar els volums de medi extret de cada pouet i es va guardar el medi en un tub tipus Falcon de 15ml de capacitat. Es va observar en tots els casos que la pèrdua de volum de medi aquós per evaporació i per la presa del ciment va ser mínima (aproximadament 0.17ml, en el pitjor dels casos). Els 24 tubs Falcon es van segellar amb parafilm i es van emmagatzemar a la nevera en posició vertical, amb l'ajuda d'una gradeta. Els 24 pouets amb els discs de ciment es van tornar a omplir amb 2ml d'aigua destil·lada a 37°C. La placa de cultiu cel·lular es va tancar i segellar novament i es va emmagatzemar a l'estufa fins la pròxima extracció.
- Als quatre i set dies es van realitzar les noves extraccions d'aigua dels 24 pouets que contenien els discs de ciment, repetint els mateixos passos explicats per l'extracció a les 24 hores.
- El resultat fou 72 mostres líquides que es van guardar a la nevera fins la data de l'assaig de plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses.

5. Tècniques de caracterització

Per poder esbrinar quin efecte pot tenir l'addició de cobalt sobre les propietats i característiques d'un ciment de fosfat de calci es realitza una caracterització des del punt de vista, físic, químic i microestructural.

A més, es realitza un estudi d'alliberament de ions cobalt per poder discernir si existeix la possibilitat d'una concentració final de ions cobalt que pogués afavorir les condicions d'existència d'un microambient favorable a l'angiogènesi, i consegüent osteogènesi. Aquesta hipòtesi podria obrir una nova etapa d'estudi, més enllà de l'abast d'aquest projecte, però de gran interès en enginyeria de teixits.

A continuació, s'exposen les tècniques aplicades per poder dur a terme la caracterització del material estudiat, així com les tècniques de química analítica emprades en l'estudi d'alliberació de ions. En cas que sigui necessari, s'explicarà el mètode de preparació de les mostres per tal d'efectuar-ne l'anàlisi.

5.1. Caracterització física

5.1.1. Temps de presa

En general, quan es treballa amb un material tipus ciment, es poden definir dues etapes: una etapa de presa o adormiment i una etapa d'enduriment. L'etapa de presa o adormiment del ciment té lloc des del moment en què la fase pols i líquida del ciment entren en contacte fins que la pasta de ciment perd progressivament la seva plasticitat i mal-leabilitat, la qual cosa implica que les propietats reològiques del material s'alteren i no es pot tornar a modelar el material. La segona etapa, l'etapa d'enduriment, es produeix quan la pasta es consolida i adquireix una consistència sòlida fins que arriba a un nivell de resistència mecànica màxima.

Durant l'etapa de presa es pot determinar el temps inicial i el temps final de presa. El temps inicial de presa es defineix com el interval de temps des del contacte de la fase pols i líquida fins la pèrdua de plasticitat en la pasta de ciment. En canvi, el temps final de presa es

considera el temps necessari per tal de què la pasta de ciment sigui el suficientment ferma per poder suportar un nivell determinat de pressió.

Per a determinar el temps de presa es va seguir el mètode de les agulles de Gillmore d'acord amb la norma ASTM C 266-08 [48]. Aquest mètode es basa en estudiar la resistència del material a ser penetrat per una agulla. El dispositiu experimental consta de dues agulles de secció circular de diferent diàmetre que transmeten diferents pesos. L'agulla de secció gran té un diàmetre de $2.12 \pm 0.05 \text{ mm}$, un pes de $113.4 \pm 0.5 \text{ g}$ i exerceix sobre la mostra de ciment una pressió de $3.2 \times 10^{-3} \text{ MPa}$. En canvi, l'agulla de secció petita té un diàmetre de $1.06 \pm 0.05 \text{ mm}$, un pes de $453.06 \pm 0.5 \text{ g}$ i exerceix una pressió de 5.0 MPa .



Fig. 5.1 Agulles de Gillmore utilitzades en la determinació del temps de presa

Es mesura el temps de presa considerant el temps inicial quan la fase pols entra en contacte amb la fase líquida dipositada en un morter de vidre. A continuació, es mesclen les dues fases amb l'ajuda d'una espàtula durant aproximadament un minut per aconseguir una pasta de ciment el màxim d'homogènia possible. Amb la pasta s'omplen tres motlles de coure cilíndrics de 10mm de diàmetre i 5mm d'altura. El temps inicial de presa ve determinat quan l'agulla lleugera no deixa empremta circular de identació visible sobre la superfície del ciment. El temps de presa final es defineix de la mateixa manera però treballant amb l'agulla més pesada. L'error comès en la mesura dels temps de presa es considera de ± 1 minut.

5.1.2. Picnometria d'heli

La picnometria d'heli és una tècnica basada en un mètode de desplaçament d'un gas inert com l'heli, per determinar la densitat real o esquelètica d'un material sòlid. És una tècnica no destructiva, i més precisa que el mètode tradicional de desplaçament d'aigua que utilitza el principi d'Arquímedes per determinar la densitat.

Es van assajar mostres dels vuit tipus diferents de ciment convenientment assecades. Cal que les mostres estiguin totalment lliures d'humitat o del contrari, s'estaria cometent un error d'assaig. Per aquest motiu, es van utilitzar les restes de bastides fragmentades durant l'assaig de compressió i pols de les bastides prèviament assajades per difracció de raigs X. Aquestes mostres van estar sotmeses a un tractament d'assecamment, tal i com s'explica en l'apartat 4.3. Les mostres es pesen abans de la picnometria per poder calcular posteriorment el valor de la densitat de cadascuna.

L'equip emprat fou un picnòmetre d'heli (AccuPyc 1330, Micromeritics) que consta de dues cambres connectades per una vàlvula. Una cambra allotja un portamostres cilíndric d'1 cm³ de capacitat i l'altra resta lliure (Fig. 5.2).

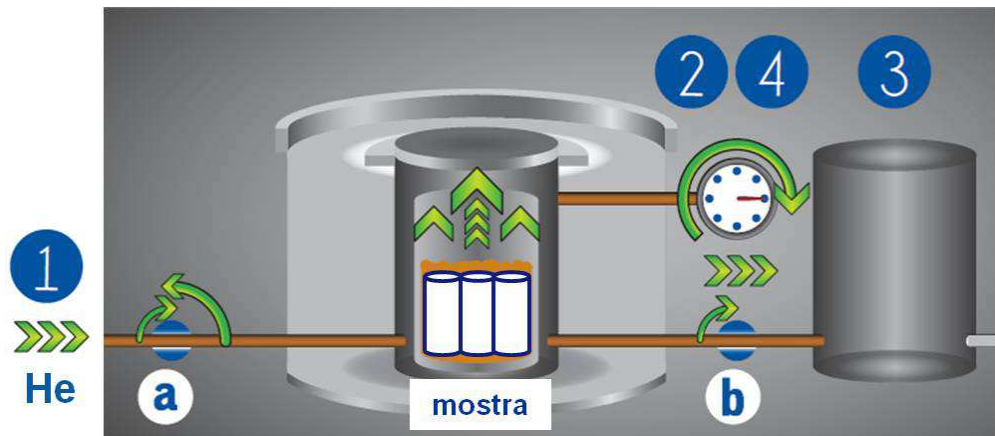


Fig. 5.2 Esquema de funcionament d'un picnòmetre d'heli [49]

Inicialment es suposa pressió atmosfèrica i temperatura ambient, i la vàlvula 'b' que connecta les cambres, resta tancada.

Aplicant la llei dels gasos ideals:

$$P_a \cdot (V_{\text{cel·la}} - V_{\text{mostra}}) = n_c \cdot R \cdot T_a \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$P_a \cdot V_{\text{exp}} = n_e \cdot R \cdot T_a \quad (\text{Eq. 5.2})$$

On,

T_a , és la temperatura ambient

P_a , és la pressió atmosfèrica

R , és la constant dels gasos ideals ($R=0,082 \text{ atm}\cdot\text{l/mol}\cdot\text{K}$)

n_c , és el nombre de mols de gas dintre la cambra on es troba la mostra

n_e , és el nombre de mols de gas dintre la cambra d'expansió

Obrint la vàlvula 'a', l'heli ocupa la cambra de la mostra fins una pressió, P_1 :

$$P_1 \cdot (V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - V_{\text{mostra}}) = n_c \cdot R \cdot T_a \quad (\text{Eq. 5.3})$$

A continuació, s'obre la vàlvula 'b' que connecta les dues cambres i s'arriba a una pressió d'equilibri, P_2 :

$$P_2 \cdot (V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - V_{\text{mostra}} + V_{\text{exp}}) = n_c \cdot R \cdot T_a + n_e \cdot R \cdot T_a \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Substituint per (Eq. 5.1) i (Eq. 5.2):

$$P_2 \cdot (V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - V_{\text{mostra}} + V_{\text{exp}}) = P_1 \cdot (V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - V_{\text{mostra}}) + P_a \cdot V_{\text{exp}} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Operant:

$$(\text{Eq. 5.6}) \quad V_{\text{mostra}} = V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - \frac{V_{\text{exp}}}{\frac{P_1 - P_a}{P_2 - P_a} - 1}$$

Transformant P_1 i P_2 a pressions manomètriques ($P_{1g}=P_1-P_a$ i $P_{2g}=P_2-P_a$) i substituint:

$$(\text{Eq. 5.7}) \quad V_{\text{mostra}} = V_{\text{cel}\cdot\text{la}} - \frac{V_{\text{exp}}}{\frac{P_{1g}}{P_{2g}} - 1}$$

L'equació final determina el volum ocupat per la fracció densa de la mostra. [49]

Per determinar la densitat real o esquelètica de cada espècimen assajat, es calcula el quocient entre la seva massa i el seu volum calculat pel picnòmetre. Aquest assaig es va reproduir tres cops per cadascun dels vuit tipus diferents de ciment (CTRL, Co-0.1, Co-0.5, Co-1.0, CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A, Co-1.0 A)

5.1.3. Determinació de propietats mecàniques per assaig de resistència a compressió

Per poder determinar la resistència màxima i el mòdul elàstic del material objecte d'estudi es van realitzar diferents sèries d'assaigs de resistència a compressió uniaxial. Al no existir cap norma específica per a ciments de fosfat de calci, es va seguir la norma ASTM F451-86 per a ciments ossis acrílics [50]. Per dur a terme els assaigs es va utilitzar una màquina hidràulica universal d'assaigs mecànics (MTS, Bionix 358) equipada d'una cel·la de càrrega de 2500N i una velocitat de desplaçament de capçal programada a 1mm/min.

Es van assajar deu provetes cilíndriques de 12mm d'altura i 6mm de diàmetre per cada composició diferent de ciment (CTRL, Co-0.1, Co-0.5, Co-1.0, CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A, Co-1.0 A). Les provetes assajades es van preparar i assecar com s'explica detalladament en l'apartat 4.3. Per a una correcta execució de l'assaig és molt important tenir alineades les mordasses de la màquina, col·locar les provetes entre els plats de compressió de manera que l'eix longitudinal d'aquestes coincideixi amb el centre d'aplicació de la càrrega i que les superfícies basals de les provetes siguin planes i paral·leles als plats de compressió. Del contrari, qualsevol desviació podria provocar la superposició d'esforços de flexió a les càrregues de compressió.

Durant els assaigs es va enregistrar amb el programa "Test Works" la corba força-desplaçament fins la ruptura de les provetes. Per poder determinar els valors de resistència màxima a compressió i rigidesa fou necessari representar la corba tensió-deformació de cada assaig. El valor màxim de la corba es va identificar com la resistència màxima a compressió i el pendent de la recta en règim elàstic, com el mòdul de Young del material assajat.

5.2. Caracterització química

5.2.1. Identificació qualitativa de fases mitjançant difracció de raigs X

Comprendre les propietats d'un material passa per conèixer l'estructura i composició d'aquest. La tècnica de difracció de raigs X és no destructiva i revela informació estructural del material a partir d'un volum de mostra en forma de pols. Per aconseguir les mostres en forma de pols, es van moldre a mà, en un morter d'àgata, bastides dels vuit tipus diferents de ciment.

En aquesta tècnica un feix de raigs X monocromàtics incideix sobre el material cristal·lí. El feix s'escindeix en diverses direccions, a causa de la disposició simètrica dels àtoms de la mostra, i per difracció, s'obté un patró d'intensitats que són funció de l'angle de difracció, " 2θ ". Utilitzant la llei de Bragg, on λ correspon a la longitud d'ona dels raigs X, es pot obtenir la distància entre plans atòmics, d .

$$\text{Llei de Bragg: } 2d \sin\theta = n \lambda \quad (\text{Eq. 5.8})$$

A partir del valor de " d " es poden obtenir paràmetres estructurals com les dimensions de la cel·la unitària, el seu volum, etc...Per obtenir els difractogrames s'utilitza un difractòmetre de raigs X, model Bruker D8 Advance. Aquest consta de tres elements bàsics: un tub generador de raigs X amb ànode de coure i monocromador a la sortida del tub, un portamostres i un detector de raigs X, model PSD Lynx-eye. L'equip segueix la configuració geomètrica Bragg-Brentano θ - 2θ (Fig. 5.3).

Els raigs X es generen en un tub de raigs catòdics per escalfament d'un filament. Els electrons emesos són accelerats aplicant un potencial de 40KV. Quan els electrons tenen suficient energia, colpegen i desallotgen electrons de la capa interna dels àtoms del material, tot deixant forats electrònics al seu pas. Aquests forats ràpidament són ocupats per electrons de nivell d'energia més elevat dels mateixos àtoms. En caure a nivells d'energia més baixos, s'emet una radiació característica ($K\alpha_1$, $K\alpha_2$) del material que conforma l'ànode. En el cas d'un ànode de coure, $K\alpha_1=1.5418 \text{ \AA}$.

Els raigs X són col·limats i dirigits cap a la mostra. Quan la geometria dels raigs X incidents sobre la mostra satisfà la llei de Bragg es produeix interferència constructiva i apareix un pic

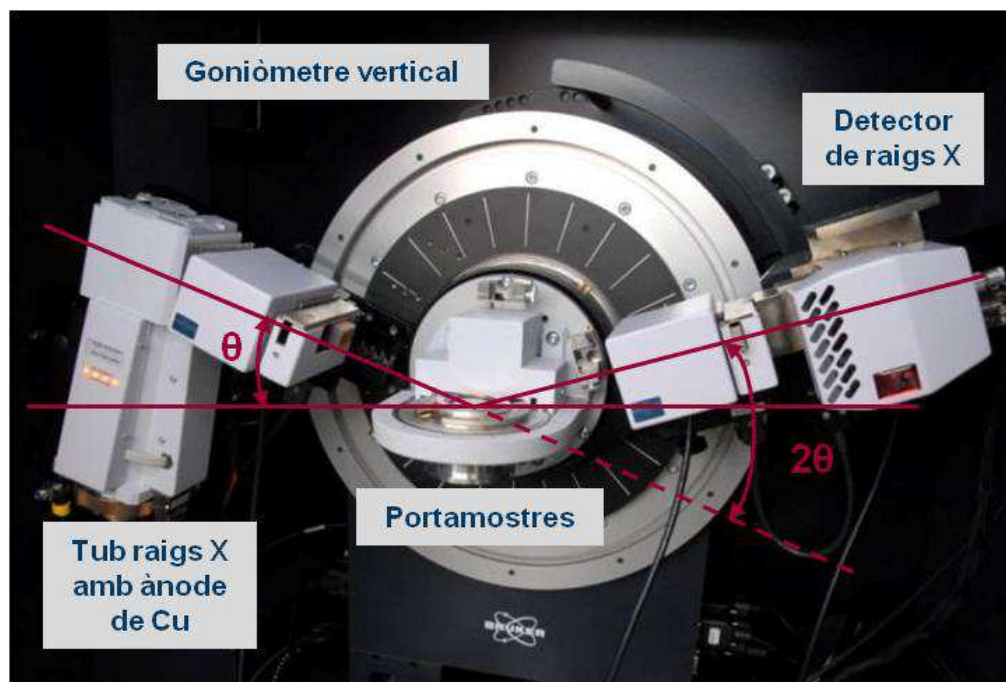


Fig. 5.3 Difractòmetre Bruker D8 Advance de configuració Bragg-Brentano θ - 2θ

en intensitat. El detector, model PSD Lynx-eye, enregistra i processa el senyal de raigs X amb un increment de pas de 0.02° i a una velocitat de recompte de 308s/pas.

La geometria d'un difractòmetre de raigs X és tal que la mostra gira en la trajectòria del feix de raigs X col·limats a un angle θ , mentre que el detector de raigs X està muntat sobre un braç que gira a un angle, 2θ . L'instrument utilitzat per mantenir l'angle i rotar la mostra s'anomena goniòmetre. Per als patrons de pols que es van recollir en el projecte, el rang d'angle d'escombrada comprenia de 10° a 80° .

5.2.2. Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier amb reflectància total atenuada (FTIR-ATR)

L'espectroscòpia infraroja permet realitzar un anàlisi qualitatiu del material, és a dir, permet identificar un compost al investigar-ne la seva composició.

Per obtenir l'espectre d'IR, es fa interaccionar un raig de llum infraroja amb la mostra, i es registra la quantitat d'energia absorbida a cada longitud d'ona. Els diferents estats vibracionals possibles d'una molècula es tradueixen en un conjunt de nivells d'energia. La separació entre aquests nivells d'energia cau dins la regió infraroja de l'espectre

electromagnètic. Les vibracions moleculars són de dos tipus: d'*estirament* (*stretching*), que afecten la longitud d'enllaç i de *flexió* (*bending*), les quals modifiquen l'angle d'enllaç. El mode vibracional molecular dóna lloc a les bandes d'absorció que apareixen en l'espectre d'IR.

Podem distingir dues zones a l'espectre d'IR segons les vibracions que s'hi observen:

- Entre 4000 i 1300 cm^{-1} : es solen observar una sèrie de bandes d'absorció provocades per vibracions de tensió senzilles, és a dir entre dos àtoms de la molècula. Identifiquen a grups funcionals.

- Entre 1400 i 600 cm^{-1} : es solen observar bandes d'absorció de vibracions moleculars, l'assignació de les quals és més difícil, ja que cadascuna d'elles està generada per absorcions individuals sumades (vibracions complexes). Per altra banda, a aquesta zona, les petites diferències en l'estructura de la molècula donen lloc a variacions importants en els màxims d'absorció. Per tant, són característiques d'un compost determinat i és per això que aquesta zona de l'espectre rep el nom d'empremta dactilar.

L'espectre IR d'una mostra es pot obtenir per transmissió o per reflexió. En el mètode per transmissió, el detector mesura la intensitat de la radiació infraroja que travessa la mostra. En canvi, per reflexió, la radiació IR passa a través d'un cristall d'elevat índex de refracció. Segons la teoria de Maxwell, per reflexió interna es crea una ona evanescent que interacciona amb la mostra i en conseqüència, aquesta ona és atenuada i s'origina un espectre per reflexió (Fig. 5.4) [51].

La tècnica d'espectroscòpia infraroja per reflexió total atenuada (IR-ATR) presenta l'avantatge sobre la tècnica per transmissió de no requerir una preparació prèvia de la mostra abans de l'anàlisi. Aquest fet implica que el mètode té la capacitat de millorar la reproductibilitat i augmentar la rapidesa de la tècnica. De fet, per realitzar l'espectroscòpia (IR-ATR) es van utilitzar les mateixes vuit mostres pols emprades en difracció de raigs X directament, sense cap preparació prèvia. L'espectròmetre d'infraroig de transformada de Fourier emprat fou un FTIR Nicolet 6700 equipat amb una font làser d'He/Ne (632.8 nm), divisor de feix de CsI, detector DTGS-CsI i software OMNIC per a la detecció en un rang espectral de 225 a 6400 cm^{-1} (far-IR i middle-IR). El dispositiu a més, constava d'un accessori Smart Orbit amb cristall de germani per mesures de reflectància.

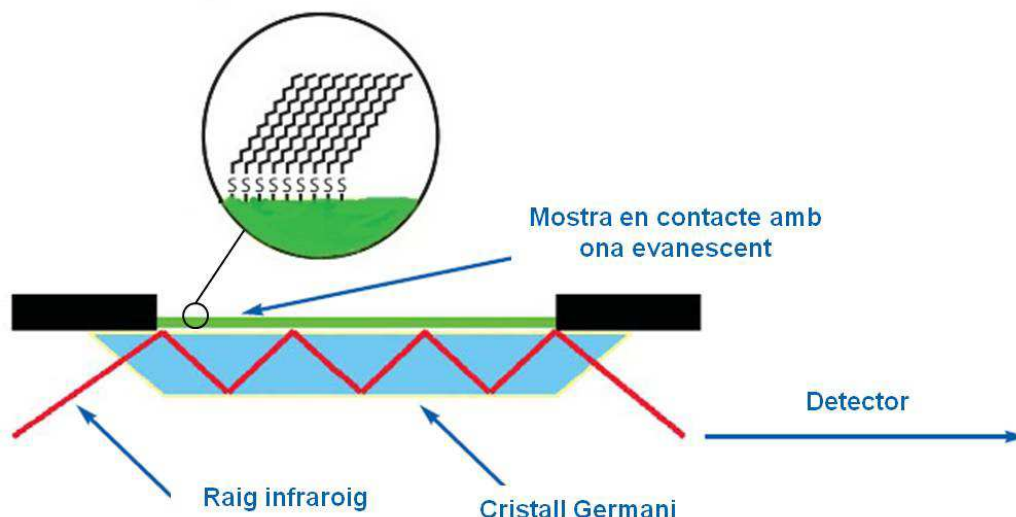


Fig. 5.4 Esquema de la tècnica espectroscòpica per reflexió total atenuada (FTIR-ATR)

5.2.3. Espectroscòpia per dispersió d'energia (EDS)

L'espectroscòpia per dispersió d'energia és una tècnica analítica que permet semiquantificar la composició atòmica superficial d'un material. Es pot utilitzar per trobar la composició química dels materials fins a una grandària de punt d'unes poques micres, i per crear mapes de composició elemental sobre una àrea de rastreig molt més àmplia.

El principi de la tècnica consisteix en generar i estudiar els raigs X característics produïts en la interacció d'un feix d'electrons sobre una mostra. Un electró d'alta energia que incideix sobre la superfície d'un material, pot excitar i arrencar un electró d'una capa interior de l'àtom, deixant una vacant electrònica al seu darrera. A posteriori, un electró d'una capa més externa pot omplir la vacant i l'energia supèrflua s'emet com a fotó de raigs X de longitud d'ona característica de l'element. Per tant, la composició elemental de la mostra es pot determinar mesurant la quantitat i energia dels raigs X emesos.

L'EDS presenta algunes limitacions, com per exemple, la possible superposició de pics de diferents elements, no pot detectar els elements més lleugers, és a dir, els elements de nombre atòmic inferior al Na, i té un límit de detecció baix: 1000-3000ppm; (0.1-0.3% en pes). Com a tècnica alternativa per a anàlisis químics més precisos i per detectar baixes

quantitats d'elements es faria servir l'espectroscòpia de raigs X dispersiva en longitud d'ona (WDS). [52]

El detector EDS s'incorpora en el dispositiu instrumental emprat en microscòpia electrònica de rastreig. Per tant, la preparació de les mostres a analitzar per EDS és anàloga a la preparació per a microscòpia electrònica. El sistema EDS utilitzat incloïa un detector sensible de raigs X (INCAPentaFETx3, 30mm², finestra ATW2), una columna SEM (Gemini, d'emissió de camp Shottky: 4pA-20nA, 0.1-30kV, resolució de 1.1nm a 20kV), un sistema de refrigeració amb nitrogen líquid i un programari per recollir i analitzar els espectres d'energia.

5.3. Caracterització microestructural

5.3.1. Mesura de la superfície específica mitjançant l'adsorció física de gas

Un paràmetre important a determinar en la caracterització d'un material porós, com el ciment de fosfat de calci, és la superfície específica. Aquesta es defineix com la relació entre l'àrea superficial i la massa d'un sòlid porós (m²/g).

En aquest treball, per determinar la superfície específica, es va emprar la tècnica d'adsorció física d'un gas inert a temperatura constant. Com a gas inert es va utilitzar nitrogen a una temperatura constant de 77K (-195°C). L'adsorció física resulta de la interacció dèbil per forces de Van der Waals entre les molècules del gas adsorbat i la superfície adsorbent de la mostra assajada [53]. La quantitat de gas adsorbat es va poder mesurar per un procediment de flux dinàmic continu amb l'ajuda de l'aparell Asap 2020 de la casa Micromeritics (Fig. 5.5).

La relació d'equilibri entre la quantitat de gas adsorbat i la pressió parcial del gas a temperatura constant ve definida per una isoterma d'adsorció. Aplicant la teoria Brunauer-Emmett-Teller (BET), a partir de l'equació d'aquesta isoterma (Eq. 5.9), es pot esbrinar el volum de gas adsorbat, 'V_m', i relacionar-lo amb la superfície específica de la mostra [54].

$$\frac{1}{V_a \left(\frac{P_0}{P} - 1 \right)} = \frac{C-1}{V_m C} \times \frac{P}{P_0} + \frac{1}{V_m C} \quad (\text{Eq.5.9})$$

On,

P , és la pressió parcial del gas adsorbat en equilibri a 77K i expressada en Pa

P_0 , és la pressió saturada del gas adsorbat, expressada en Pa

V_a , és el volum de gas adsorbat en condicions estàndard de temperatura i pressió (273.15K i 1.013×10^5 Pa), expressat en ml

V_m , és el volum aparent de gas adsorbat necessari per formar una monocapa molecular sobre la superfície de la mostra, en condicions estàndard. Expressat en ml.

C , és una constant adimensional relacionada amb l'entalpia d'adsorció del gas



Fig. 5.5 Esquema de l'aparell de flux dinàmic Asap 2020, Micromeritics usat en la desgasificació i l'assaig d'adsorció física de nitrogen

Es van analitzar un total de vuit mostres diferents de ciment: CTRL, Co-0.1, Co-0.5, Co-1.0, CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A, Co-1.0 A. Les mostres emprades consistien en fragments de provetes de ciment que provenien de l'assaig mecànic a compressió. Per a l'assaig d'adsorció les mostres han d'estar completament seques i necessiten d'una preparació prèvia que consisteix en una etapa de desgasificació. L'objectiu d'aquesta etapa és eliminar gasos i vapors que han pogut quedar adsorbits a la superfície de les mostres durant l'etapa de preparació d'aquestes, la seva manipulació o durant l'emmagatzematge. La desgasificació és una etapa crítica per obtenir uns valors de superfície específica precisos i fiables. Per dur-la a terme, també s'empra l'aparell Asap 2020, Micromeritics.

5.3.2. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

Per poder caracteritzar les microestructures que es creen durant l'etapa de presa del ciment, es van examinar les superfícies fracturades de les provetes de ciment utilitzades en l'assaig mecànic a compressió mitjançant microscòpia electrònica de rastreig. Es va emprar un microscopi electrònic de rastreig Zeiss Neon 40, amb una columna Sem Gemini d'emissió de camp Shottky: 4pA-20nA, un voltatge d'acceleració de 0.1-30kV i resolució d'1.1nm a 20kV. Es van prendre imatges a 10, 20 i 40 kX augments.

La preparació de mostres per observar-les amb un microscopi electrònic és relativament senzilla, però s'ha de garantir l'absència d'humitat en les mostres i la conducció elèctrica d'aquestes per poder observar les característiques superficials d'interès. Les mostres de ciment fragmentades es van enganxar a sobre muntures d'un aliatge d'alumini mitjançant cinta de carboni adhesiva a doble cara. Com les mostres objecte d'estudi no són d'un material conductor, va ser necessari fer un recobriment de carboni per evaporació tèrmica amb un aparell d'alt buit (EMITECH K950X). Després del recobriment, es van afegir unes petites gotes de pintura de plata col·loidal entre les mostres de ciment i les muntures d'alumini, per garantir totalment un camí conductor i poder obtenir unes imatges el màxim de nítides per estudiar-les.

5.4. Tècniques analítiques emprades en l'estudi d'alliberament de ions cobalt

5.4.1. Colorimetria

La colorimetria és un mètode òptic que permet la determinació de la concentració d'una substància que sigui present en una mostra en continguts inferiors a l'1%. La substància a determinar, en aquest treball cobalt, ha d'ésser susceptible de desenvolupar una espècie colorada, a partir de l'addició d'uns reactius, i a més, la intensitat d'aquesta coloració ha d'estar relacionada linealment amb la concentració d'analit dins un interval determinat [55].

Quan un feix de llum travessa una dissolució amb un solut absorbent, la intensitat d'aquest feix es disminueix per causa de l'absorció d'una part de l'energia radiant d'una freqüència característica per part de molècules o d'ions del solut quan s'exciten a nivells energètics superiors. En general es pot dir que:

$$I_o = I_a + I_t + I_r \quad (\text{Eq.5.10})$$

On, I_o és la intensitat de llum incident, I_a és la intensitat de llum absorbida, I_t és la intensitat de llum transmesa i I_r és la intensitat de llum reflectida. Els nostres ulls detecten longituds d'ona de la llum visible no absorbida, és a dir, la llum transmesa.

L'absorbància, A , de la substància es relaciona amb la intensitat de la llum incident i de la llum transmesa segons l'equació coneguda com a llei de Bouguer-Lambert-Beer:

$$A = -\log T = -\log I_t/I_o = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (\text{Eq.5.11})$$

On, A és l'absorbància, T és la transmitància, I_t és la intensitat de llum transmesa, I_o és la intensitat de llum incident, ϵ és l'absortivitat molar, l és el camí òptic i c és la concentració de la substància que absorbeix.

En aquest treball, per quantificar la concentració de cobalt existent en el medi on es van submergir els discs de ciment, es va seguir el mètode colorimètric desenvolupat per Liu et al. [56] El reactiu del sistema colorimètric estava format per blau de metilè (MB, Sigma-Aldrich M9140), 2-aminotiofenol (ATP, Sigma-Aldrich 274240) i nitrat de coure (II) trihidratat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich 61194). Inicialment es van preparar 20 ml d'una dissolució

aquosa de blau de metilè 0.04mM, 20ml d'una dissolució aquosa de nitrat de coure 1.5mM i 20ml d'una dissolució d'aminotiofenol 9mM amb etanol. El reactiu obtingut a partir de les tres espècies es va anomenar MB-ATP-Cu²⁺, i es va deixar incubar durant tres minuts abans d'usar. A continuació, el reactiu es va afegir a una sèrie de dissolucions aquoses de clorur de cobalt de concentracions entre 0.1 i 1mM. Després d'un període d'incubació de dos minuts, segons Liu et al., apareixia una gradació de colors en funció de les concentracions de cobalt detectades pel sistema, com s'observa en la Fig. 5.6



Fig. 5.6 Gradació de colors corresponent a la concentració de ions Co²⁺ detectats [56]

El mecanisme d'en Liu et al. es suposa sensible a la detecció de cobalt dintre d'un rang de concentracions comprès entre 0.1 i 1.1mM. A baixes concentracions de cobalt, per sota de 0.8mM, l'oxidació dels enllaços C-N i S-C a C=N i C=S és acompanyada per l'aparició de color marró en les dissolucions estoc de clorur de cobalt. En canvi, quan la concentració de ions cobalt supera els 0.8mM, el grau d'oxidació dels enllaços C-N del blau de metilè, provoquen un viratge de color cap al verd en les dissolucions (Fig. 5.7).

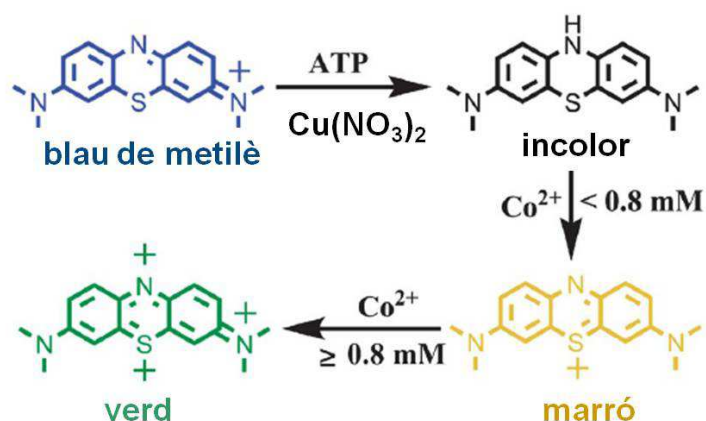


Fig. 5.7 Sensibilitat del sistema colorimètric [56]

Per l'estudi d'alliberament de ions cobalt es va intentar reproduir el sistema colorimètric desenvolupat per Liu et al. [56] diferents cops però sense èxit. Seguint el protocol descrit per aquest autor per desenvolupar el reactiu, MB-ATP-Cu²⁺, s'arribava a un producte d'aspecte tèrbol degut a la precipitació d'alguna espècie. A més, el reactiu desenvolupat no presentava gens de sensibilitat als ions cobalt quan s'afegia a les dissolucions de clorur de cobalt. Per tant, es va abandonar el protocol del citat autor i se'n va desenvolupar un altre a partir d'aquest.

El nou protocol seguit per preparar el reactiu MB-ATP-Cu²⁺ va consistir en:

- Preparar dissolucions aquoses de blau de metilè (MB) i nitrat de coure (Cu(NO₃)₂) a 5 mM i 1 M, respectivament.
- Afegir 20 µl d'aminotiofenol (ATP) a 20 ml d'etanol. A continuació, gota a gota i utilitzant un agitador, s'hi afegien 160 µl de la dissolució de MB i posteriorment, 30 µl de dissolució de Cu(NO₃)₂.
- Deixar incubar dos minuts mentre s'agita.

5.4.2. Plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS)

Mentre que el sistema colorimètric seleccionat per dur a terme l'estudi d'alliberament de ions cobalt ens pot donar una orientació qualitativa en els resultats, el plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses, ens permet quantificar acuradament l'alliberament de cobalt en un medi aquós.

Es va escollir la tècnica de plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS) vers el plasma d'inducció acoblat a espectrometria d'emissió òptica (ICP-OES) perquè la primera tècnica presenta un nivell de detecció més baix. Mentre que la tècnica analítica ICP-OES presenta un rang mínim de detecció que oscil·la entre 50 ppm i 50% en pes, la tècnica ICP-MS presenta una sensibilitat mínima entre 0.1 ppm i 1% en pes. [57]

La tècnica analítica ICP-MS es basa en la vaporització, dissociació i ionització dels diferents elements químics d'una mostra a l'interior d'un plasma d'argó que opera a 6000°C. A continuació, en un espectròmetre de masses, els ions es separen en base de la seva

relació massa-càrrega. Els ions, al sortir de l'espectròmetre de masses, colpegen la superfície activa d'un detector que genera un recompte electrònic. Per a una anàlisi quantitativa, la concentració de cada element es determina per la comparació entre els recomptes d'intensitat mesurats per a una mostra i una corba de calibratge que s'ha generat per a l'element que es busca [58].

Les mostres a analitzar per ICP-MS van consistir en 72 extractes d'aigua de volum aproximat a 2ml. Prèviament, cada extracte aquós havia constituït el medi on s'havia submergit un disc de ciment per cadascuna de les vuit composicions diferents de ciment, durant períodes de temps iguals a 1 dia, 4 dies i 7 dies. Tal i com s'explica detalladament a l'apartat 4.4, cada disc de composició diferent, es va replicar tres cops, produint un total de 72 mostres a analitzar per ICP-MS. L'aparell emprat per dur a terme l'anàlisi fou un espectròmetre de masses Perkin Elmer, model Elan 6000 amb plasma d'inducció inclòs.

La preparació de les mostres per a aquesta anàlisi consisteix en realitzar una dilució 1:5 per cadascuna de les 72 mostres amb àcid nítric (HNO_3), de concentració 1% en pes. Les dilucions amb àcid nítric es realitzen per dues raons diferents. En primer lloc, per provocar la dissolució de qualsevol analit sòlid que pogués existir en la mostra a analitzar. El segon motiu rau en el fet que la concentració de ions cobalt es determina mitjançant una corba de calibratge amb una concentració coneguda d'aquest analit. Per tant, la concentració de les mostres ha de ser diluïda per estar dins d'aquesta corba de calibratge i poder obtenir una lectura precisa.

5.5. Anàlisi estadística dels resultats

Les proves d'igualtat de mesures es van realitzar aplicant el test estadístic: "t de Student". El test opera decidint si una diferència en la mitjana mostral entre dues mostres és estadísticament significativa, i llavors poder afirmar que les dues mostres corresponen a distribucions de probabilitat de mitjana poblacional diferent, o per contra, afirmar que la diferència de mitjanes es pot deure a oscil·lacions estadístiques atzaroses. El nivell de significació, " α ", es va fixar en un valor igual a 0.05.

6. Resultats i discussió

6.1. Caracterització física

6.1.1. Temps de presa

Es van determinar els temps de presa o adormiment per dues sèries de mostres de ciment utilitzant el mètode de les agulles de Gillmore. Una sèrie estava formada per quatre tipus de mostres de ciment, la fase líquida de les quals contenia un 2.5% en pes de Na_2HPO_4 (agent accelerant, "A") i dissolucions aquoses al 0, 0.1, 0.5 i 1% de CoCl_2 . En canvi, la segona sèrie estava constituïda per quatre tipus de ciment, la fase líquida dels quals, no contenia agent accelerant, però sí diferents percentatges en pes de CoCl_2 : 0, 0.1, 0.5 i 1%. Els temps

Taula 6.1 Temps de presa per dues sèries de ciments amb relació L/P=0.35ml/g Les dues variables en les sèries són: l'addició o absència d'accelerant (A) i el diferent contingut en pes de CoCl_2 (0, 0.1, 0.5 i 1%). La desviació estàndard fou considerada d'un minut en totes les mesures.

Codi de la mostra	Temps de presa (min)	Codi de la mostra	Temps de presa (min)
CTRL	30 ± 1	CTRLA	8 ± 1
Co-0.1	60 ± 1	Co-0.1 A	10 ± 1
Co-0.5	57 ± 1	Co-0.5 A	9 ± 1
Co-1.0	58 ± 1	Co-1.0 A	9 ± 1

Comparant els temps de presa de les dues mostres control es pot afirmar que l'addició d'agent accelerant implica reduir el temps de presa un 30%.

En canvi, l'addició de cobalt té un efecte retardador en el temps de presa dels ciments sense agent accelerant. S'observa que la presència de cobalt, independentment de la concentració d'aquest, duplica els temps de presa quan no s'empra agent accelerant en la fase líquida del ciment. Saint-Jean et al. i Pina et al., també van reportar un augment en el temps de presa del ciment amb l'addició de ions Sr^{2+} [59,60]. Altres estudis demostren que l'addició de ions com el Mg^{2+} i el Si^{4+} , també produeixen un efecte retardador [61,62].

Per últim, cal destacar que l'addició de cobalt no interfereix en l'efecte de l'agent accelerant, independentment de la concentració de cobalt present.

6.1.2. Densitat esquelètica

Es va determinar la densitat esquelètica de vuit tipus de mostres de ciment per picnometria d'heli. Les vuit mostres formaven part de dues sèries diferents de mostres de ciment. Una primera sèrie formada per les mostres de ciment sense agent accelerant i amb contingut de cobalt del 0.1, 0.5 i 1% en pes (CTRL, Co-0.1, Co-0.5 i Co-1.0). I una segona sèrie, representant els ciments amb incorporació d'agent accelerant i cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes (CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A i Co-1.0 A). Es van realitzar tres assajos de picnometria per cadascun dels vuit tipus de ciment esmentats. Els resultats per la densitat esquelètica dels vuit tipus de ciment apareixen representats en la gràfica (Fig. 6.1)

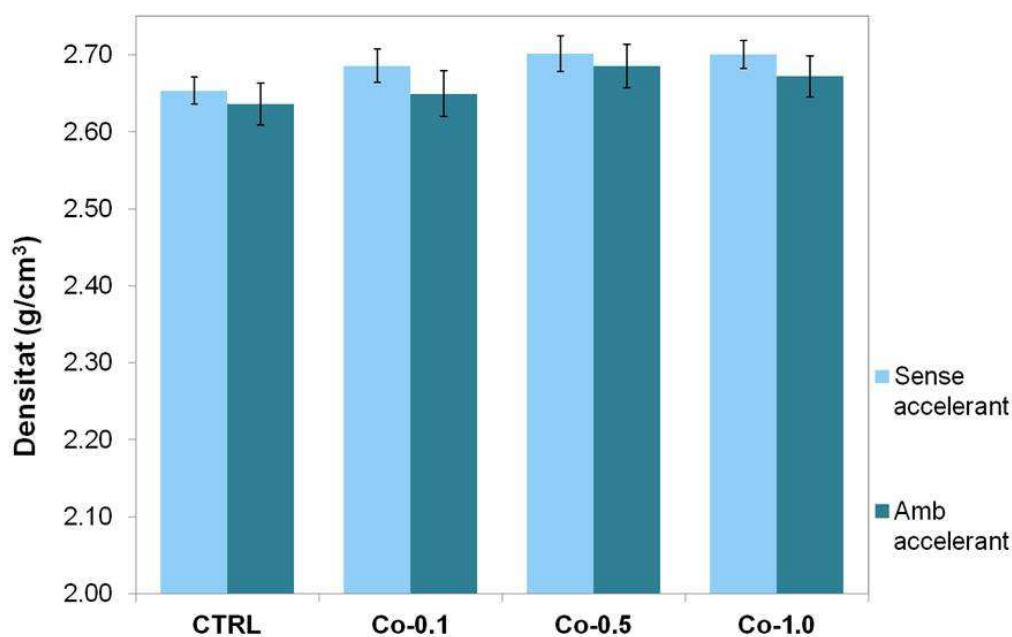


Fig. 6.1 Densitat esquelètica de dues sèries de ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes. Les sèries difereixen entre sí per la presència d'agent accelerant. La relació L/P de tots els ciments fou 0.35 ml/g

Es va observar una lleugera tendència a augmentar la densitat esquelètica amb la introducció de cobalt en la fase líquida dels ciments de fosfat de calci. El petit augment en

els valors de la densitat seria proporcional a la quantitat de cobalt afegida a la fase líquida del ciment. L'efecte de l'addició de cobalt sobre la densitat és independent a la presència o absència d'agent accelerant.

D'altra banda, tal i com s'esperava, la introducció d'agent accelerant en els ciments provoca una lleugera davallada en la densitat. Durant la preparació de les mostres es va intuir aquest possible efecte de l'accelerant sobre la densitat, ja que la presència d'aquest dificultava la barreja entre la fase líquida i sòlida del ciment i la manipulació de la pasta de ciment. Aquestes condicions, probablement, van donar lloc a una pasta de ciment poc homogènia, amb aire atrapat i difícil d'emmotllar. Aquests fets van tenir com a conseqüència directa, certa disminució en els valors de la densitat de les mostres.

6.1.3. Determinació de propietats mecàniques per assaig de resistència a compressió

Mitjançant l'assaig a compressió uniaxial es van determinar dues propietats mecàniques dels ciments objecte d'estudi, la resistència màxima a compressió i el mòdul elàstic. Els ciments de fosfat de calci aconsegueixen el seu valor màxim de resistència mecànica després de la fase de presa i enduriment del ciment, resultat de la reacció de hidròlisi de l' α -TCP:



Durant la presa i enduriment del ciment es produeixen dos fenòmens simultàniament: la progressiva dissolució de les partícules d' α -TCP i la precipitació de cristalls d'hidroxiapatita deficient en calci. Els cristalls de CDHA creixen i formen una xarxa de cristalls entrelaçats cada cop més densa. És precisament aquest entrecruament de cristalls el que dóna la resistència mecànica als ciments de fosfat de calci. Per aquesta raó, les propietats mecàniques dels CPC dependran directament de la seva microestructura.

Les provetes de ciment que es van preparar per l'assaig mecànic es van deixar prendre i endurir durant onze dies, immerses en aigua destil·lada a 37°C. Les mostres diferien entre sí per la composició de la seva fase líquida. D'una banda, la fase líquida d'un grup de quatre tipus de mostres contenia dissolucions aquoses de clorur de cobalt al 0, 0.1, 0.5 i

1% en pes. En canvi, la fase líquida del segon grup de mostres, a més de contenir cobalt a les mateixes concentracions, també contenia agent accelerant. La relació líquid pols es va mantenir constant a 0.35 ml/g en totes les mostres. L'assaig es va realitzar a temperatura ambient i es van sotmetre a compressió fins la ruptura deu espècimens completament assecats per cada composició diferent de ciment.

Els valors de la resistència màxima a compressió es mostren en la següent gràfica (Fig. 6.2):

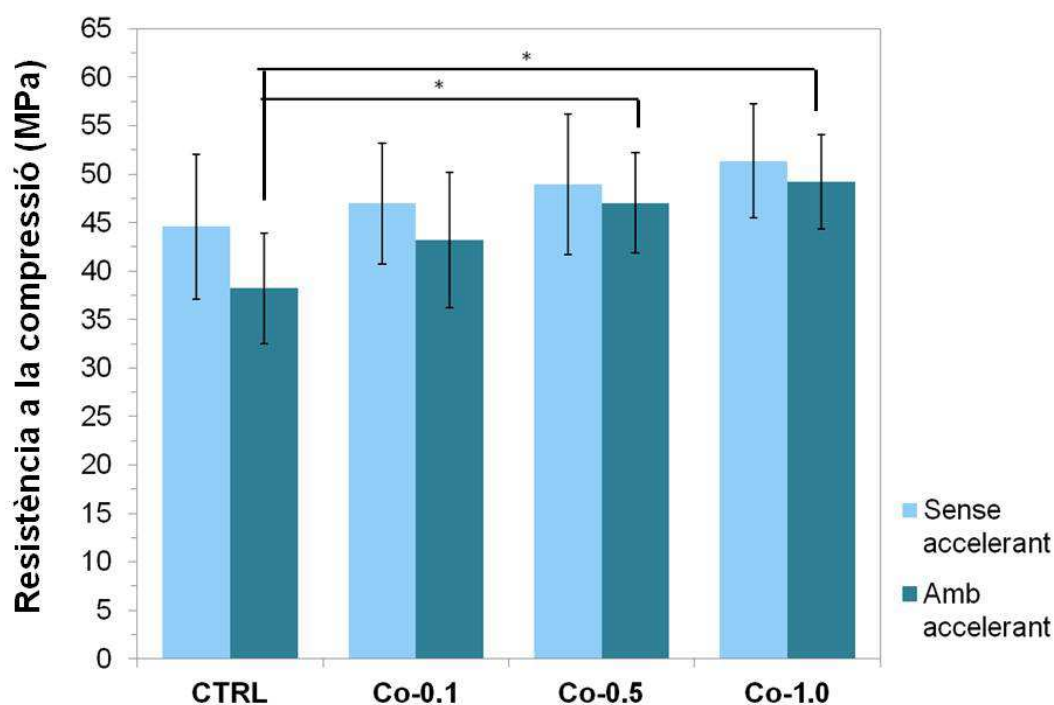


Fig. 6.2 Resultats de la resistència màxima a la compressió de provetes de CPC dopat amb cobalt completament assecades. (*) indica diferències estadísticament significatives. Es va considerar un interval de confiança del 95% ($p < 0.05$)

En els resultats s'observa que la presència de cobalt en els ciments de fosfat de calci fa augmentar lleugerament els valors de resistència mecànica, tant en els ciments que contenen accelerant, com els que no en contenen. L'augment és proporcional a la quantitat de cobalt afegida. Es van trobar diferències significatives entre les mostres control amb accelerant i les mostres amb un contingut de cobalt del 0.5 i 1% en pes. La lleugera tendència a millorar la resistència mecànica amb l'addició de cobalt també fou observada

per Hoppe et al. quan es van dopar bastides de vidres bioactius amb un 1 i 5% de cobalt [44].

Un altre fet a destacar és la disminució en els valors de la resistència mecànica dels ciments dopats amb cobalt quan s'afegeix un agent accelerant com l'hidrogenfosfat de sodi al 2.5%. En estudis previs, altres autors com Ginebra et al., ja havien reportat una disminució en la resistència mecànica associada a l'ús d'agent accelerant [3].

Per acabar de caracteritzar el comportament mecànic dels ciments dopats amb cobalt també s'adjunta un gràfic amb els valors del mòdul elàstic determinats mitjançant l'assaig a compressió (Fig. 6.3).

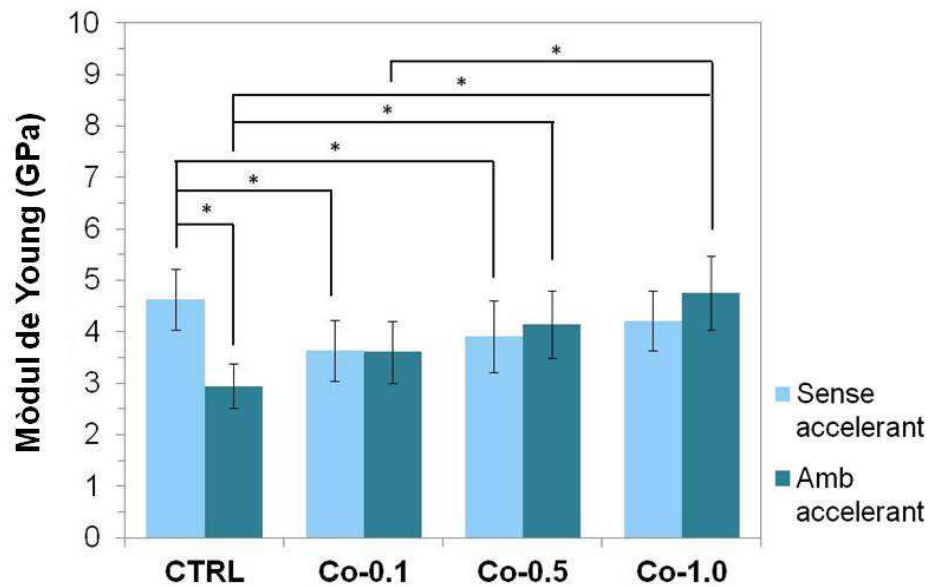


Fig. 6.3 Mòdul de Young de mostres de CPC dopat amb cobalt (*) indica diferències estadísticament significatives. Es va considerar un interval de confiança del 95% ($p < 0.05$)

Per a les mostres sense accelerant, el mòdul elàstic del material presenta una lleugera tendència a disminuir amb la incorporació de ions cobalt. Zhang et al., associen la davallada del mòdul elàstic d'un ciment de fosfat de calci que presenta partícules d' α -TCP sense reaccionar, a un mecanisme de propagació de clivelles que apareixen entre les partícules d' α -TCP sense reaccionar i la matriu de CDHA del ciment [62]. En els difractograms dels ciments objecte d'aquest estudi, també apareixien pics d' α -TCP, la qual cosa indicava que quedava una petita quantitat de fase α present després de la reacció de transformació a CDHA. L'existència de partícules d' α -TCP romanents en els ciments

estudiats en el treball ens pot dur a plantejar la possibilitat que existeixi el mecanisme descrit per Zhang et al. Cabria la possibilitat que la incorporació de cobalt en els ciments no obstaculitzés el mecanisme citat, o bé, la presència de cobalt podria d'alguna manera ajudar a descohesionar les zones de contacte entre les partícules d' α -TCP romanents i la matriu CDHA. Es podria estar afavorint l'activació del mecanisme de propagació de clivelles, i com a resultat, provocar un material més fràgil.

Tanmateix, en les mostres de ciment amb accelerant i cobalt, el mòdul elàstic del ciment sembla augmentar. Aquest fet es podria explicar amb l'existència del complex de coordinació que es forma entre els ions $(\text{HPO}_4)^{2-}$ i els ions cobalt. Aquesta espècie podria estar actuant com a reforç, i així mostrar resistència al mecanisme de propagació de clivelles entre la matriu CDHA i les partícules d' α -TCP romanents.

6.2. Caracterització química

6.2.1. Identificació qualitativa de fases mitjançant difracció de raigs X

En la figura (Fig. 6.4) es mostren els difractogrames obtinguts per a les vuit mostres de ciment assajades després d'haver-les deixat prendre durant onze dies en medi aquós a 37°C.

La identificació dels pics es va dur a terme per comparació amb les fitxes cristal·logràfiques: JCPDS 09-0348 per l' α -TCP i JCPDS 09-0432 per l'HA (Joint Committee on Powder Diffraction)

En els difractogrames es detecten els pics característics de la fase HA i alguns pics de baixa intensitat pertanyents a la fase α -TCP. Aquest fet ens indica que la transformació d' α -TCP a hidroxiapatita deficient en calci ha estat quasi bé completa, però queda un mínim romanent d' α -TCP.

Fixant-nos en l'evolució dels difractogrames de les mostres que contenen cobalt sense accelerant, s'observa que al augmentar la concentració de cobalt, augmenta l'amplada dels pics d'HA. D'aquesta observació se'n desprèn la idea que amb la presència de cobalt es desenvolupa fase HA, però el material esdevé menys cristal·lí. Aquest fet es pot apreciar en

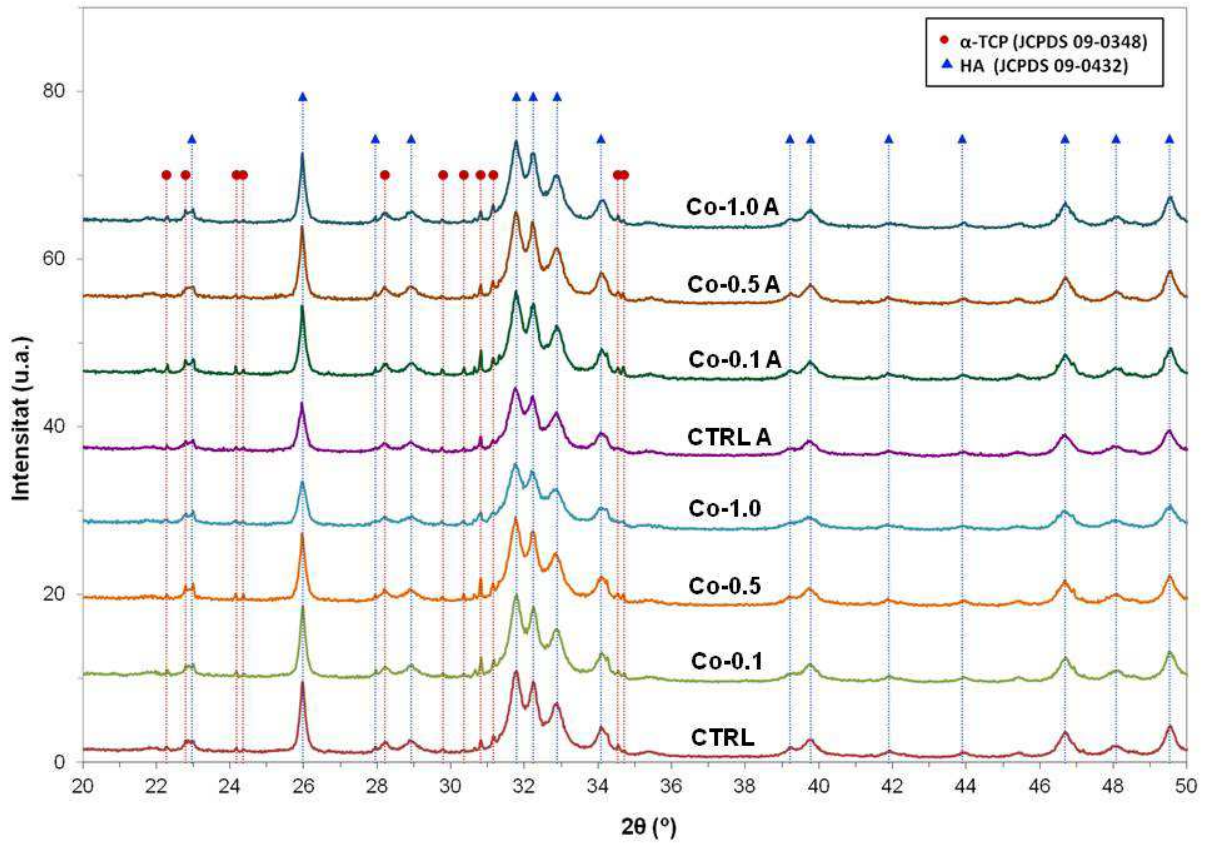


Fig. 6.4 Difractogrames corresponents a les vuit mostres de ciment assajades en forma pols. La indexació dels pics coincideix amb les fitxes cristal·logràfiques de l' α -TCP (JCPDS 09-0348) i l'HA (JCPDS 09-0432)

els pics de difracció a 25.9° . Aquests pics representen la família de plans de Miller (002) i reflecteixen el creixement del cristall al llarg de l'eix c de la cel·la cristal·lina d'HA.

En els difractogrames no apareix cap desplaçament en la posició dels pics de difracció que pugui indicar que els ions cobalt estiguin substituint els ions calci en l'estructura CDHA. L'únic que es pot afirmar és que l'addició de cobalt distorsiona l'estructura, però no s'hi incorpora.

6.2.2. Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier amb reflectància total atenuada (FTIR-ATR)

Mitjançant la tècnica d'espectroscòpia infraroja es van poder identificar les molècules que componen el material d'estudi, a través de l'anàlisi de la vibració característica dels seus enllaços químics. La figura (Fig. 6.5) mostra els espectres característics d'infraroig de les dues sèries de mostres de ciment, que difereixen entre sí per l'absència o l'addició d'agent accelerant. Alhora, els espècimens de cada sèrie es diferencien pel seu contingut de cobalt (Sèrie sense accelerant: CTRL, Co-0.1, Co-0.5 i Co-1.0. Sèrie amb accelerant: CTRL A, Co-0.1 A, Co-0.5 A i Co-1.0 A). Els vuit tipus de mostres es van deixar prendre durant onze dies en medi aquós a 37°C.

En els espectres de les vuit mostres, les bandes d'absorció van aparèixer en la regió d'infraroig amb nombres d'ona menors a 1500cm^{-1} . Aquesta regió es coneix amb el nom de "regió d'empremta dactilar" del compost. En aquesta franja apareixen les bandes d'absorció típiques per a elements del tercer període, com el fòsfor, i per a enllaços simples corresponents a les vibracions d'esquelet i d'àtoms més pesats que el hidrogen o el carboni. L'assignació de les diferents bandes d'absorció que apareixen en els espectres de la figura (Fig. 6.5) es resumeix a la taula (6.2).

En els espectres de les mostres control es van observar tres bandes d'absorció, a 965cm^{-1} , 1030cm^{-1} i 1085cm^{-1} , corresponents a les vibracions que s'assignen als grups PO_4^{3-} , d'estructura tetraèdrica. A 965cm^{-1} es va localitzar una banda molt dèbil corresponent al mode de vibració ν_1 de tensió simètrica P-O del grup PO_4^{3-} . A 1085cm^{-1} es va detectar una absorció en forma de coll pertanyent al mode de vibració ν_3 , extensions triplement degenerades de l'enllaç P-O, del grup PO_4^{3-} . A 1030cm^{-1} apareix clarament una banda ampla que també correspon al mode de vibració ν_3 del grup PO_4^{3-} . Aquestes tres bandes (a 965cm^{-1} , 1030cm^{-1} i 1085cm^{-1}) augmenten en intensitat en els espectres de les mostres de ciment que contenen cobalt. Aquest efecte es manifesta de manera notable en la banda situada a 1030cm^{-1} .

A més de les vibracions que s'assignen al grup PO_4^{3-} , apareixen dues bandes a 870cm^{-1} i 1135cm^{-1} , atribuïdes al grup HPO_4^{2-} i característiques de la hidroxiapatita no estequiomètrica $(\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH})$. L'apatita no estequiomètrica consisteix en una xarxa cristal·lina amb vacants en posicions de Ca^{2+} i OH^- . La neutralitat es manté per la

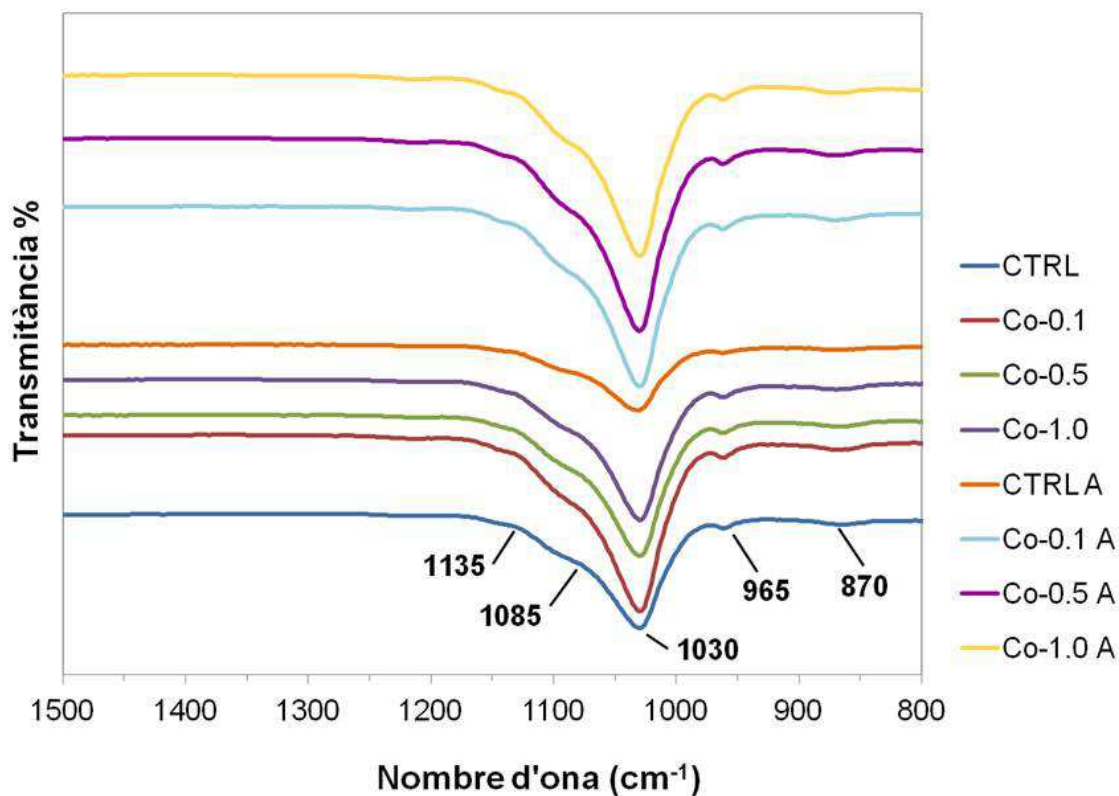


Fig. 6.5 Espectres d'infraroig per dues sèries de CPC (amb i sense accelerant). Els espècimens de cada sèrie tenen un contingut de cobalt en pes diferent (0%, 0.1%, 0.5% i 1%) Els vuit ciments es van deixar prendre durant onze dies en medi aquós a 37°C

Taula 6.2 Bandes d'absorció d'infraroig detectades per als vuit ciments endurits després d'un període d'immersió en aigua d'onze dies a 37°C [64,65]

Nombre d'ona (cm ⁻¹)	Vibració
1135, (espatlla molt poc intensa)	mode de vibració ν_3 , corresponent als grups HPO_4^{2-}
1085, (espatlla poc intensa)	mode de vibració ν_3 , corresponent als grups (PO_4)
1030, (banda intensa)	mode de vibració ν_3 , corresponent als grups (PO_4)
965, (banda poc intensa)	mode de vibració ν_1 , corresponent als grups (PO_4)
870, (banda poc intensa)	mode de vibració ν_5 , corresponent als grups HPO_4^{2-}

*Ginebra et al., 1997

incorporació de ions H^+ , que són part dels grups HPO_4^{2-} que hi apareixen. Aquestes dues bandes s'aprecien subtilment en les posicions 870 i 1135cm^{-1} de les mostres control. La banda a 1135cm^{-1} s'observa com un coll de curvatura molt oberta corresponent al mode de vibració ν_3 del grup HPO_4^{2-} . Tanmateix, la banda a 870cm^{-1} apareix de manera quasi imperceptible en l'espectre de la mostra control i representa el mode de vibració ν_5 de deformació de l'enllaç P-O(H) en el grup HPO_4^{2-} . En els espectres de les mostres que contenen cobalt, la intensitat d'aquestes dues bandes, característiques de la hidroxiapatita no estequiomètrica, no es veu alterada malgrat la seva addició.

6.2.3. Espectroscòpia per dispersió d'energia (EDS)

Es va realitzar una anàlisi EDS per semiquantificar la presència de cobalt en la composició atòmica de les superfícies dels ciments objecte d'estudi. Es van analitzar un total de vuit mostres de ciment, el període de presa dels quals fou onze dies d'immersió en aigua destil·lada a 37°C . Una primera sèrie de mostres estava composta per una mostra control de ciment de fosfat de calci i tres mostres de ciment amb un contingut en cobalt del 0.1, 0.5 i 1% en pes. La segona sèrie constava d'una mostra control de ciment de fosfat de calci amb accelerant i tres mostres que contenien agent accelerant i cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes.

Cal destacar que les concentracions de cobalt en les mostres objecte d'estudi són valors que es troben pròxims i en el mateix llindar de detecció de la tècnica EDS. Com es va esmentar en l'apartat 5.2.3, aquesta tècnica té aproximadament un nivell de sensibilitat de l'ordre de 1000-3000 ppm (0.1-0.3% en pes) del component a detectar. Per aquest motiu, es va abandonar la idea de fer un "mapping" de la superfície de les mostres per trobar cobalt, però es van generar tres espectres per cada tipus de ciment, punxant a tres zones diferents de la superfície de la mostra.

El resultat fou que només les mostres de ciment que contenien cobalt en un 1% en pes van generar espectres amb senyal per a cobalt. Els pics per a cobalt en els espectres van aparèixer per un valor característic de $K\alpha$ igual a 6.9keV . A continuació, s'adjunten les taules de les composicions elementals de la superfície de les dues mostres de ciment que contenien un 1% de cobalt (Co-1.0 i Co-1.0A)

Taula 6.3 Composició elemental de la superfície de la mostra de ciment Co-1.0

Espectre n°	O (% atòmic)	P (% atòmic)	Cl (% atòmic)	Ca (% atòmic)	Co (% atòmic)	Ca/P
1	62.05	15.46	0.11	21.94	0.39	1.42
2	67.01	13.25	0.09	19.28	0.31	1.46
3	29.23	24.83	0.12	35.28	0.36	1.42
Mitjana	52.76±20.53	17.85±6.14	0.11±0.01	25.50±8.57	0.35±0.04	1.43±0.02

Taula 6.4 Composició elemental de la superfície de la mostra Co-1.0 A

Espectre n°	O (% atòmic)	Na (% atòmic)	P (% atòmic)	Cl (% atòmic)	Ca (% atòmic)	Co (% atòmic)	Ca/P
1	52.81	0.45	17.77	0.13	28.56	0.28	1.61
2	45.07	0.28	17.89	0.11	25.76	0.21	1.44
3	62.19	0.71	15.23	0.08	21.87	0.16	1.44
Mitjana	53.36±8.57	0.48±0.22	16.96±1.50	0.11±0.03	25.40±3.36	0.22±0.06	1.49±0.10

6.3. Caracterització microestructural

6.3.1. Determinació de la superfície específica

Els resultats de l'assaig d'adsorció física de gas nitrogen van permetre determinar la superfície específica dels vuit tipus diferents de ciments. Observant la gràfica (Fig. 6.6) dels resultats, s'aprecia com la introducció de ions cobalts i ús d'agent accelerant no tenen efecte sobre la superfície específica dels ciments.

Com es veurà en la següent secció, aquests resultats correlacionen perfectament amb les microestructures observades en les imatges obtingudes per microscòpia electrònica de rastreig.

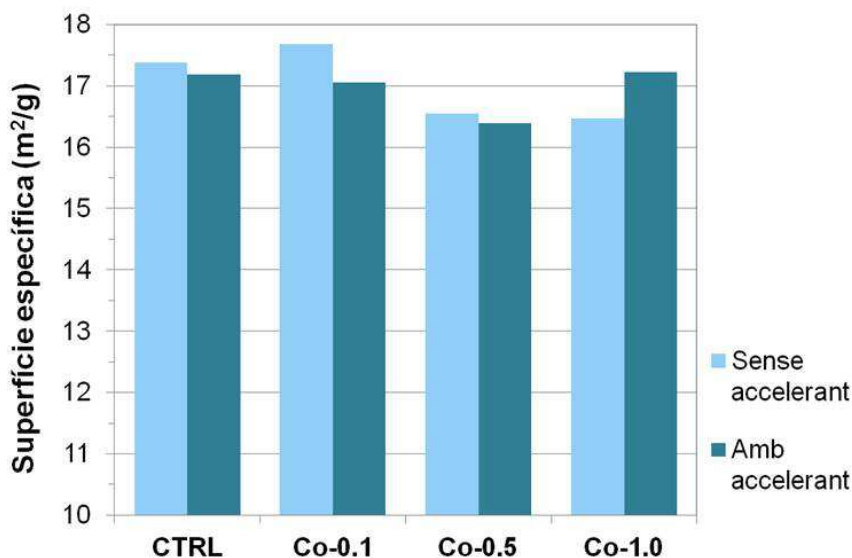


Fig. 6.6 Gràfica dels valors de la superfície específica determinada pels vuit tipus diferents de ciment. Les variables són: l'ús d'agent accelerant i la presència de ions cobalt a concentracions: 0.1, 0.5 i 1% en pes

6.3.2. Microestructura observada per microscòpia electrònica de rastreig

Tal i com es va mencionar anteriorment, la microestructura dels ciments està relacionada directament amb les propietats mecàniques d'aquests. Característiques com porositat de la mostra, topografia, morfologia i distribució dels cristalls tenen un efecte directe sobre les propietats mecàniques del material. A més, conèixer la topografia superficial dels ciments és de vital importància en el camp dels biomaterials per poder entendre com les cèl·lules interactuen amb el material, com es poden adherir, proliferar i diferenciar.

Per poder conèixer la microestructura dels ciments objecte d'estudi, es van capturar imatges de la superfície fracturada de les provetes dels vuit tipus diferents de ciment a 10, 20 i 40KX augments.

En les micrografies **a** i **c** de la figura (Fig. 6.7), corresponents a la superfície de fractura de les mostres control i control amb accelerant a 10KX, s'observa el mateix tipus de microestructura sense diferències rellevants entre elles. En ambdues micrografies no es detecten partícules d' α -TCP sense reaccionar, però es poden distingir els espais que ocupaven inicialment. Aquests espais ara es troben ocupats per cristalls grans de tipus laminar envoltats d'una capa gruixuda de cristalls més petits de morfologia acicular. En les

micrografies **b** i **d** (Fig. 6.7), de major número d'augment, es pot apreciar la gran compacitat que presenten els petits cristalls aciculars de CDHA que formen la closca, i la poca densitat que presenta la disposició de grans cristalls laminars a l'interior de la cavitat.

Entre aquestes estructures descrites, apareix un altre tipus de morfologia cristal·lina que consisteix en estructures arborescents denses i entrecreuades de petits cristalls en forma d'agulles. Un exemple d'aquestes, s'observa clarament en la micrografia **b**, (Fig. 6.7).

També cal esmentar l'aparició d'algunes cel·les de Hadley en la micrografia **a** (Fig. 6.7). Aquestes estructures són típiques en la microestructura dels ciments. Apareixen com a cavitats buides envoltades per una capa gruixuda de petits cristalls. Ocupen el lloc on prèviament hi havia una partícula d' α -TCP, que desapareix al dissoldre's i reaccionar completament. Com les micrografies pertanyen a la superfície de fractura de les bastides de ciment, aquestes cavitats apareixen tallades per la meitat, la qual cosa porta a pensar que han estat el defecte crític que ha provocat la fractura en aquestes provetes.

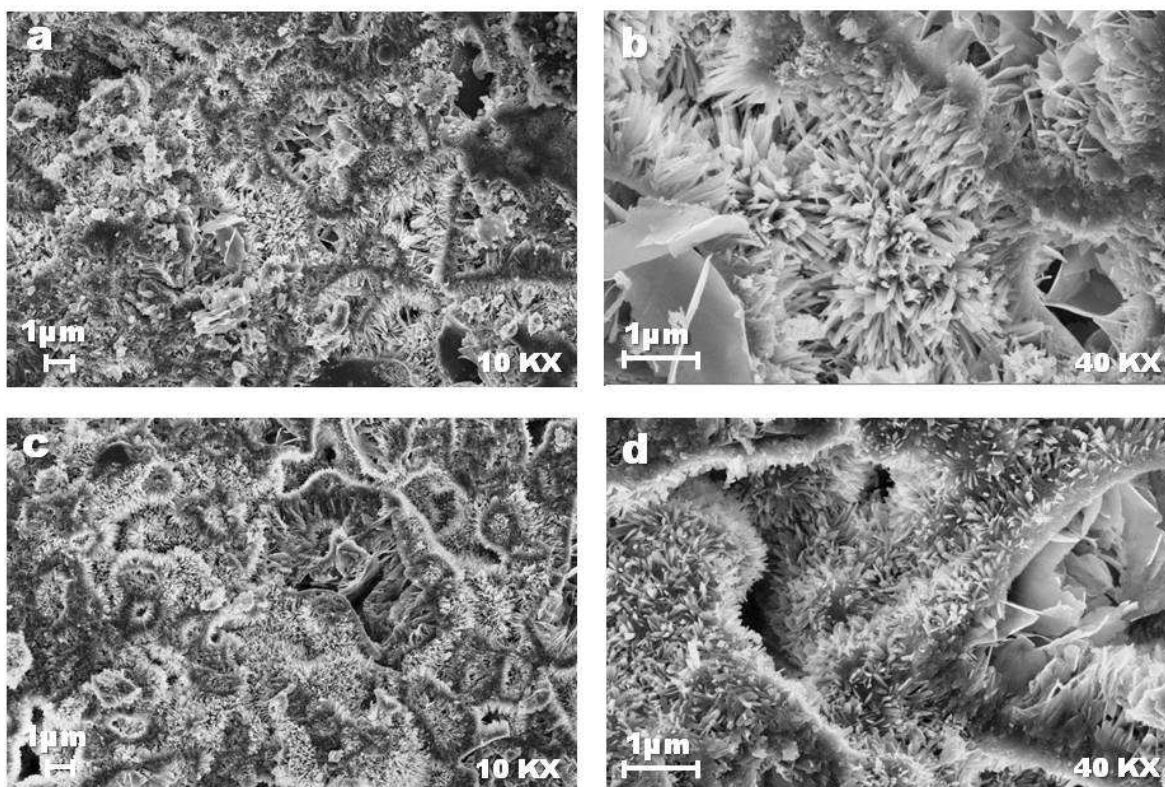


Fig. 6.7 Micrografies SEM de la superfície de fractura de provetes CPC sense cobalt, a 10 i 40KX augments. Els ciments van prendre durant onze dies immersos en aigua destil·lada, a 37°C i la seva relació L/P era de 0.35 ml/g. Les micrografies **a** i **b** corresponen a la mostra CTRL, les micrografies **c** i **d** corresponen al ciment CTRL A

En la figura (Fig. 6.8) s'adjunten sis micrografies que mostren la superfície de fractura de les mostres de ciment: Co-0.1, Co-0.1 A, Co-0.5, Co-0.5 A, Co-1.0 i Co-1.0A, a 10KX augments. Les mostres de ciment d'aquestes micrografies es diferencien de les mostres de ciment de la (Fig. 6.7) per la incorporació de cobalt en la fase líquida dels ciments. Observant les noves micrografies, es pot afirmar que l'addició de cobalt no té efecte sobre

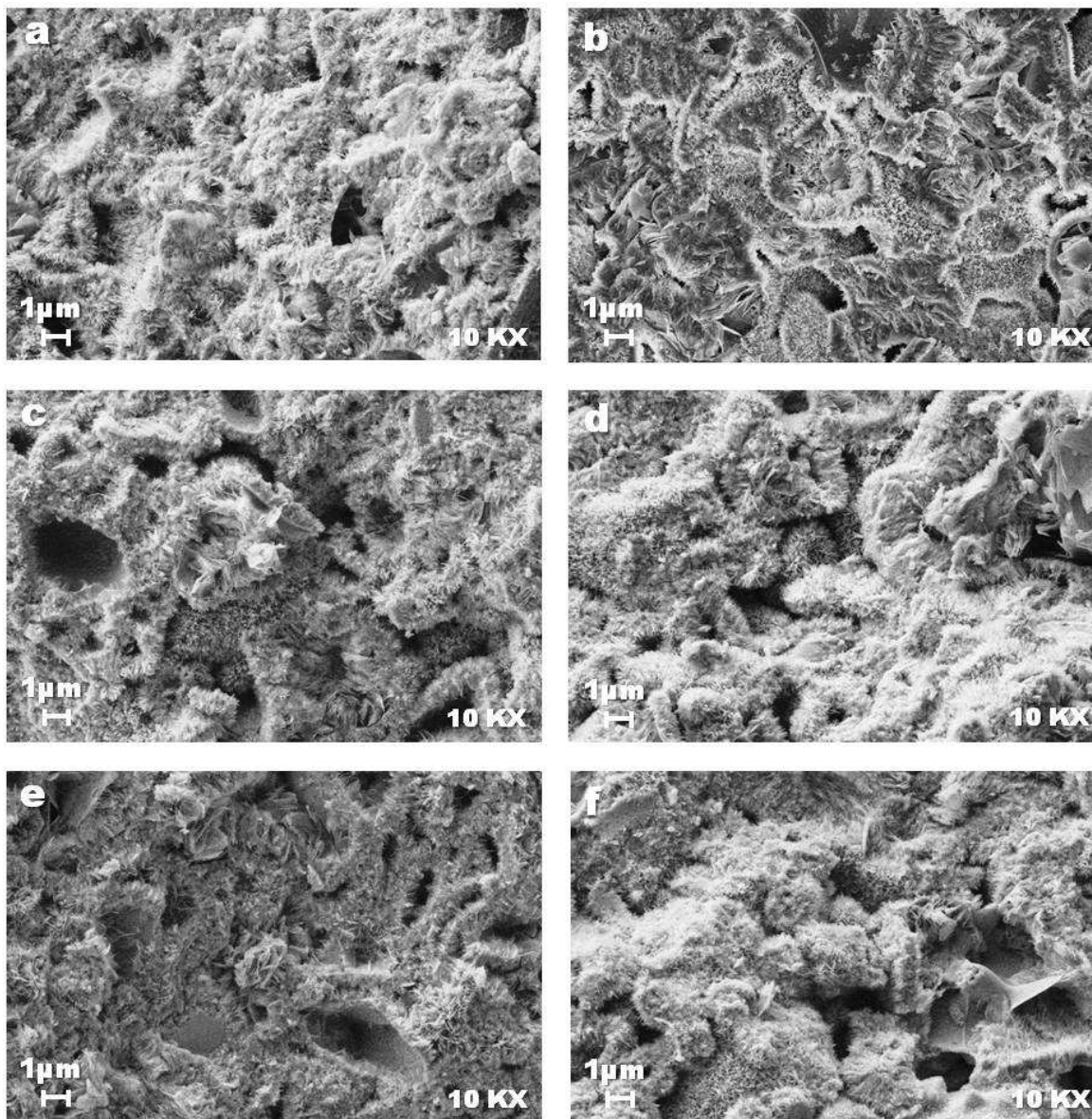


Fig. 6.8 Micrografies SEM de la superfície de fractura de ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt, amb i sense agent accelerant, a 10KX augments. Els ciments van prendre durant onze dies immersos en aigua destil·lada, a 37°C i la seva relació L/P era de 0.35 ml/g. (**a**: Co-0.1, **b**: Co-0.1 A, **c**: Co-0.5, **d**: Co-0.5 A, **e**: Co-1.0, **f**: Co-1.0A)

la microestructura del ciment. Tampoc hi ha indicis de canvi en la microestructura per l'ús d'agent accelerant. La similitud de la microestructura d'aquestes sis mostres entre elles és molt gran. Totes elles presenten una topografia densa i molt rugosa. També s'hi observa la presència de cel·les de Hadley. En les micrografies **c**, **d** i **f** de la figura (Fig. 6.8), es detecten espais buits entre agregats cristal·lins que semblen generar un tipus de porositat micromètrica en forma de llargues cavitats connectades entre sí.

6.4. Estudi d'alliberament de ions cobalt

En el present treball, el nivell d'alliberament de ions cobalt ha de ser necessàriament controlat. És un requisit fonamental que la quantitat de ions cobalt alliberada es trobi per sota d'una concentració de 100-200 μM [37,42]. Si s'excedís aquest rang, podrien existir problemes de citotoxicitat o bé, la diferenciació normal de les cèl·lules mesenquimals estromals del moll de l'os (BMSC), es podria veure alterada.

Es pretén elucidar quina concentració de cobalt s'allibera a partir de discs de CPC dopats amb cobalt al 0.1, 0.5 i 1%, que han estat immersos en 2 ml d'aigua desionitzada un màxim de 7 dies. Les mesures de les concentracions de cobalt foren seleccionades a temps de 24h, quatre dies i set dies, com a màxim, perquè la cascada de processos que estimulen i activen la regeneració òssia succeeixen immediatament com a mecanisme de resposta a la fractura de teixit ossi. Dintre d'aquesta cascada de processos es troba l'etapa d'angiogènesi o vascularització, que es veu estimulada per un microambient en condicions d'hipòxia. Tal condició d'hipòxia, es veu afavorida a la vegada, per la presència de quantitats de cobalt a nivell micro.

6.4.1. Per colorimetria

Es va intentar dur a terme un anàlisi colorimètric per determinar la concentració de ions cobalt alliberats en medi aquós. Amb aquest propòsit, primer es va desenvolupar el reactiu MB-ATP-Cu²⁺, seguint els passos del segon protocol descrit en l'apartat 5.4.1.

Es va observar que en acabar de preparar el reactiu, als dos minuts d'incubació, apareixia un precipitat com s'aprecia en la imatge (Fig. 6.9). Tot i així, es va utilitzar el reactiu per veure si aquest era capaç de detectar ions cobalt i poder fer una primera aproximació de resultats per colorimetria.



Fig. 6.9 Reactiu ATP-MB-Cu²⁺ sense precipitats, a l'instant final de la seva preparació i el mateix reactiu amb precipitats, després de 2 minuts.

Es va preparar una sèrie de cinc tubs Eppendorf d'1.5ml de capacitat. Un tub contenia 750 µl d'aigua desionitzada i els altres quatre contenien 750 µl de dissolucions de clorur de cobalt a 0.6, 1, 1.4 i 7 mM. Ràpidament s'hi van afegir 250µl de reactiu ATP a tots cinc. Tot seguit, es van agitar breument amb l'ajuda d'un agitador vòrtex i es van deixar incubar. Instantàniament, van aparèixer nous precipitats a l'interior dels Eppendorfs. Després de 30-40 minuts d'incubació, va aparèixer una gradació de colors en la sèrie de tubs Eppendorf, en funció de les concentracions de ions cobalt detectades, però els precipitats no van desaparèixer (Fig. 6.10). Es va intentar separar els precipitats de les mostres centrifugant, però el color de les mostres quedava atrapat en els precipitats i la mostra líquida resultava incolora.

Per tant, degut a l'aparició de precipitats en el reactiu, la inestabilitat de l'espècie colorada, l'aparença tèrbola de les dissolucions, la manca de reproductibilitat i la poca precisió en la detecció de les concentracions, es va decidir abandonar la colorimetria com a tècnica analítica en l'estudi d'alliberament de ions cobalt.

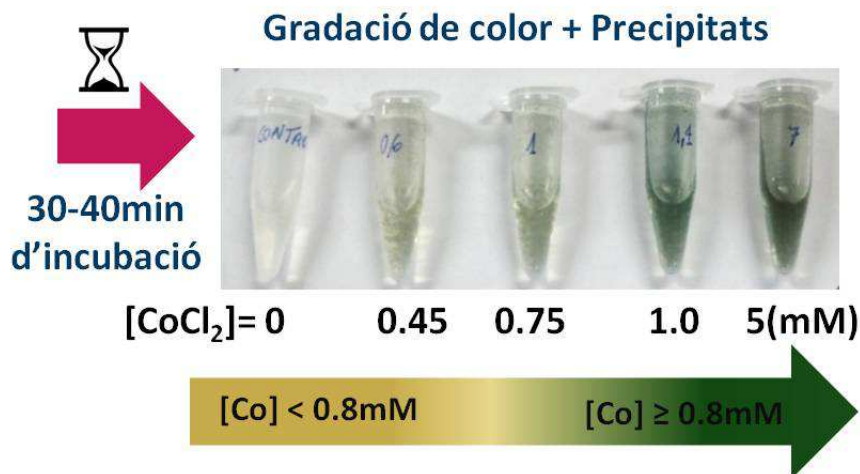


Fig. 6.10 Gradació de colors que provoca el reactiu ATP-MB-Cu²⁺ en funció de la detecció de diferents concentracions de ions cobalt

6.4.2. Per plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS)

Abans de realitzar qualsevol assaig es va fer un càlcul de la quantitat màxima de ions cobalt que podien alliberar els discs de CPC dopats amb cobalt en medi aquós. Per al càlcul, es va suposar que el cobalt que contenia el disc més gran de cadascun dels tipus de ciment, s'alliberava completament en set dies en 2ml d'aigua desionitzada. El càlcul es va realitzar per poder fer una valoració posterior dels resultats obtinguts experimentalment. El procediment de fabricació dels discs de CPC dopats amb cobalt, es va explicar, pas a pas, en l'apartat 4.4 d'aquest treball. La concentració màxima a la qual es podria arribar, suposant que s'alliberés tot el cobalt incorporat a la fase líquida del ciment, es pot llegir a la taula 6.5.

La determinació experimental de les concentracions de cobalt alliberades durant un, quatre i set dies en 2 ml d'aigua desionitzada es va aconseguir mitjançant la tècnica analítica de plasma d'inducció acoblat a espectrometria de masses (ICP-MS). Es van sotmetre a anàlisi tres rèpliques de cadascun dels medis on havia estat immers un disc de cadascuna de les vuit composicions diferents de CPC a 37°C. Els temps d'immersió de les mostres van ser d'1, 4 i 7 dies. Els detalls de l'obtenció de les 72 mostres que es van analitzar, es troben en l'apartat 4.4 del treball.

Taula 6.5 Resultats del càlcul de les concentracions màximes de cobalt que poden ser alliberades en el medi on es van submergir cadascun dels discs de CPC dopats amb cobalt. Es suposa que el cobalt que conté el disc de CPC, s'allibera al 100%.

	Concentració de cobalt alliberada màxima teòricament
Disc CPC amb 0.1% Co	370 μM
Disc CPC amb 0.5% Co	2182 μM
Disc CPC amb 1.0% Co	3510 μM

Els resultats de l'assaig per ICP-MS s'han representat en dues gràfiques. D'una banda, una gràfica (Fig. 6.11) per les concentracions de cobalt del medi on es van submergir els discs de CPC dopats amb cobalt sense accelerant, i una altra gràfica (Fig. 6.12), per les concentracions de cobalt obtingudes per la immersió de discs de CPC que contenien agent accelerant i cobalt.

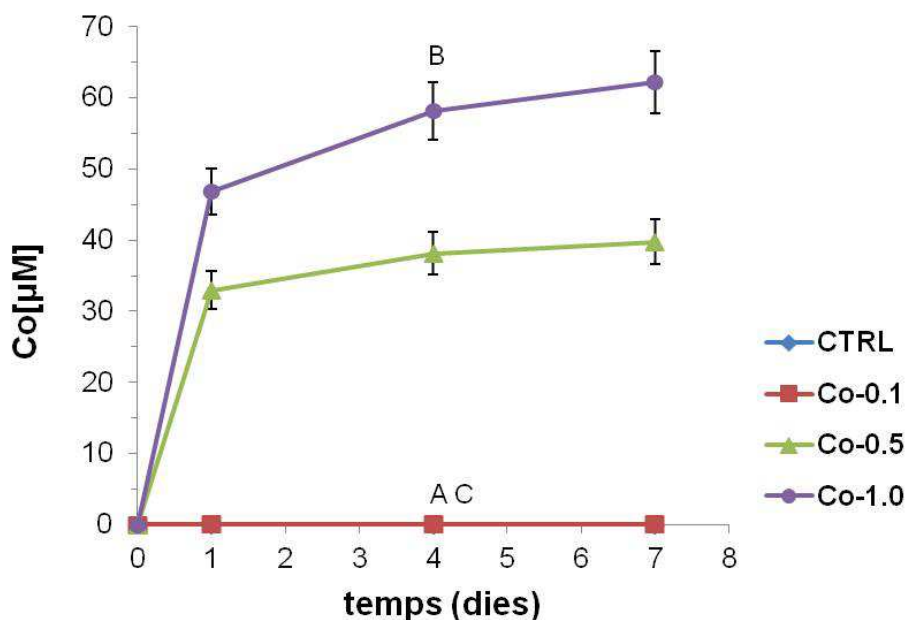


Fig. 6.11 Gràfica de les concentracions de cobalt a temps: 1,4 i 7 dies pels discs de CPC dopats amb cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes. Les diferents lletres expressen diferències significatives utilitzant un interval de confiança del 95% ($p < 0.05$)

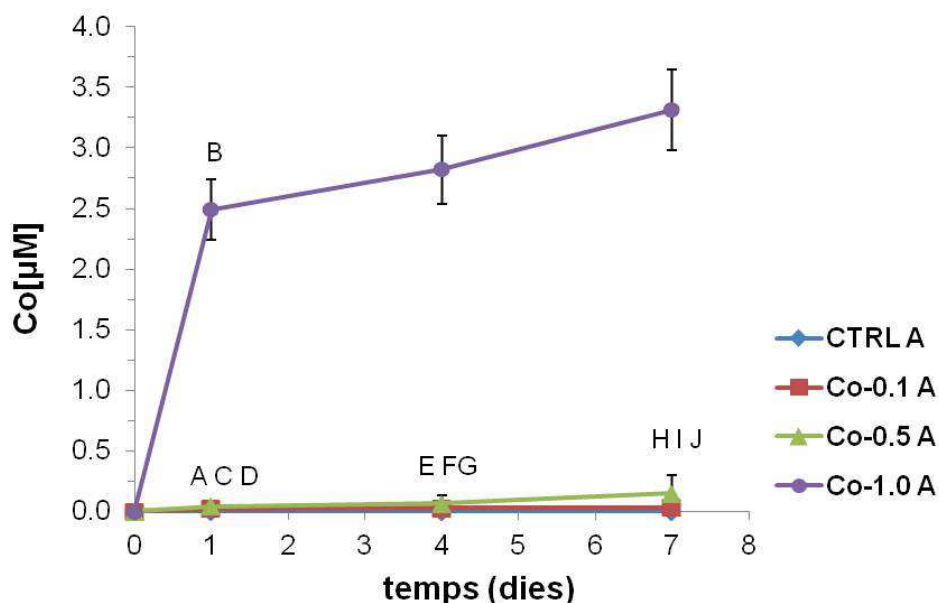


Fig. 6.12 Gràfica de les concentracions de cobalt a temps: 1,4 i 7 dies pels discs de CPC que contenen agent accelerant i han estat dopats amb cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes. Les diferents lletres expressen diferències significatives utilitzant un interval de confiança del 95% ($p < 0.05$)

En ambdues gràfiques s'observa que és durant les primeres 24h quan es produeix més alliberament de ions cobalt. De fet, durant aquest període s'allibera aproximadament un 75% del cobalt total alliberat. A partir de les 24 hores continua havent-hi alliberament però es produeix de manera més gradual. Tal i com s'esperava, en totes dues gràfiques el valor màxim de cobalt alliberat correspon a les mostres de ciment que contenen un 1% de cobalt. A la taula 6.6, es troben els valors màxims de ions cobalt alliberats per cada tipus de ciment.

Destaca el fet que el nivell d'alliberament per les mostres de ciment dopades amb cobalt i sense accelerant és més elevat, gairebé vint cops més, que en els ciments que contenen agent accelerant. Aquest fet es veuria explicat per la hipòtesi que entre els ions cobalt i els ions hidrogenfosfat (HPO_4^{2-}) de la solució accelerant es forma un precipitat, en forma de complex de coordinació, tal com s'ha explicat anteriorment. Degut a l'estabilitat d'aquesta nova espècie, el cobalt quedaria atrapat en l'estructura del complex i l'alliberament d'aquest al medi es veuria molt restringit. En canvi, en les mostres de ciment que no contenen accelerant, els ions cobalt, que com s'havia vist, no s'han incorporat a la hidroxiapatita deficient en calci, tenen més facilitat en alliberar-se.

Taula 6.6 Valors experimentals màxims de la concentració de ions cobalt alliberada per discs de CPC dopats amb cobalt, amb i sense accelerant, en 2ml d'aigua desionitzada a 37°C

	Concentració de cobalt alliberada màxima experimental
Disc CPC amb 0.1% Co	0.060 μM
Disc CPC amb 0.5% Co	39.725 μM
Disc CPC amb 1.0% Co	62.180 μM
Disc CPC amb 0.1% Co + agent accelerant	0.034 μM
Disc CPC amb 0.5% Co + agent accelerant	0.150 μM
Disc CPC amb 1.0% Co + agent accelerant	3.316 μM

També cal destacar que els valors màxims experimentals d'alliberament de ions cobalt representen aproximadament un 2% dels valors d'alliberament del càlcul teòric, on es considerava que s'alliberava tot el cobalt que contenen els discs de ciment. Això implica que el valor màxim d'alliberament de ions cobalt es trobi en 62 μM per la composició de ciment amb un 1% de cobalt en pes. Com aquest valor es troba per sota de 100-200 μM , no s'entra en conflicte amb la restricció principal del treball. Complir amb aquest requisit fonamental, implica la viabilitat dels ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt al 0.1, 0.5 i 1% en pes, com a materials biocompatibles.

7. Conclusions

Com a conseqüència del present treball es poden extreure les següents deduccions i conclusions:

1. Després d'onze dies de presa, la fase principal dels ciments estudiats és hidroxiapatita, tot i que encara es detecta una mínima presència de fase α -TCP. Per tant, la reacció de transformació d' α -TCP a hidroxiapatita deficient en calci per hidròlisi és gairebé del 100%
2. L'addició de cobalt no interfereix en el desenvolupament de la fase hidroxiapatita però disminueix el grau de cristal·linitat dels ciments.
3. El temps de presa dels ciments es duplica amb la presència de cobalt respecte els ciments, la fase líquida dels quals, consistia únicament en aigua destil·lada. En canvi, la presència de cobalt no interfereix en l'efecte de reducció dels temps de presa de l'agent accelerant.
4. L'addició de cobalt en la fase líquida dels CPC suposa un lleuger increment en els valors de la resistència màxima a compressió.
5. Els valors de superfície específica no es veuen afectats pel dopatge amb ions cobalt.
6. No s'aprecien canvis microestructurals en la superfície dels ciments dopats amb cobalt en presència o absència d'ús d'agent accelerant.
7. En l'estudi d'alliberament de ions cobalt es va detectar que el nivell de ions alliberat es troba per sota del rang considerat com citotòxic. Els ciments amb més capacitat d'alliberar ions cobalt són aquells que no contenen agent accelerant en la seva fase líquida i que són dopats amb un 1% de cobalt en pes.

8. Perspectives futures

Existeixen estudis i experiències interessants a considerar més enllà de l'abast d'aquest projecte. Com a resultat directe de les conclusions extretes d'aquest treball, els ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt estudiats, presenten propietats adequades per ser considerats com a biomaterials candidats per estimular la regeneració de teixit ossi. Aquest treball obriria la porta a avaluar in vitro la resposta cel·lular dels ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt en una següent fase d'estudi.

També seria interessant estudiar com es podria reduir el temps de presa dels ciments dopats amb cobalt sense afegir hidrogenfosfat de sodi, com agent accelerant a la fase líquida del ciment. Com s'ha vist, l'addició d'aquest agent accelerant comporta l'aparició d'una espècie complex que redueix considerablement l'alliberament de ions cobalt. La solució seria suprimir el seu ús, però això comportaria augmentar considerablement el temps de presa del ciment. Aquest fet implicaria no complir un requisit clínic com és un temps de presa curt. Es podria estudiar com reduir el temps de presa amb altres estratègies, sense renunciar al dopatge amb cobalt, fins arribar a un compromís entre la quantitat de cobalt alliberada i un temps de presa que satisfés el requeriment clínic.

9. Costos econòmics i impacte mediambiental

9.1. Costos econòmics

El pressupost del projecte es desglossa en tres conceptes diferents: el concepte de costos dels materials de laboratori i reactius, el concepte referent a tècniques de caracterització i màquines de laboratori i el concepte de cost del personal d'enginyeria implicat.

El cost del consum energètic de les màquines emprades, el cost del seu manteniment, així com els costos d'amortització de les mateixes, estan inclosos en el preu per hora, preu per mostra analitzada o preu per assaig.

Taula 9.1 Costos de les matèries primeres i material de laboratori

Concepte	Preu / unitat d'amidament			Material Emprat			Cost (€)
	€/g	€/ml	€/unitat	g	ml	unitats	
Hidrogenfosfat de calci (CaHPO_4)	0.06			524.00			31.44
Carbonat de calci (CaCO_3)	0.31			192.00			59.52
Hidroxiapatita precipitada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0.02			12.00			0.24
Hidrogenfosfat de sodi (Na_2HPO_4)	0.06			15.00			0.90
Clorur de cobalt	1.59			5.81			9.24
Blau de metilè	0.25			0.60			0.15
2-aminotiofenol		1.27			0.78		0.99
Nitrat de coure	2.70			7.25			19.58
Etanol absolut		0.03			400.00		12.00
Pot de polipropilè amb tapa estèril (60ml)			0.21			30.00	6.30
Pot de polipropilè amb tapa estèril (30ml)			0.15			60.00	9.00
Tubs microcentrifuga tipus Falcon (15ml)			0.32			72.00	23.04
Tubs microcentrifuga tipus Eppendorf (1.5ml)			0.05			150.00	8.10
Well-plate estèril de 24 pouets			2.60			3.00	7.80
Puntes de pipeta estèrils			0.09			300.00	27.00
Guants de làtex estèrils			0.04			250.00	10.00
TOTAL							225.29

Taula 9.2 Costos tècniques de caracterització i màquines de laboratori

Tècniques de caracterització	Preu			Emprat		Cost (€)
	€/hora	€/mostra	€/assaig	hores	mostres	
Difracció de raigs X		7.00			8.00	56.00
ATR-IR	5.14			8.00		41.12
Picnometria d'heli	30.00			32.00		960.00
Superfície específica BET		7.32			8.00	58.56
SEM / EDS	106.74			8.00		853.92
Assaig de compressió uniaxial	80.00			12.00		960.00
ICP-MS			570.00			570.00
Subtotal						3499.60
Màquines laboratori	€/hora	€/mostra	€/assaig	hores	mostres	Cost (€)
Forn elèctric	8.00			60.00		480.00
Moli planetari	6.00			1.00		6.00
Mesclador automàtic	1.70			2.00		3.40
Subtotal						489.40
TOTAL						3989.00

Taula 9.3 Cost del personal d'enginyeria

Concepte	Preu	Dedicació	Cost (€)
	€/hora	hores	
Director del projecte	75.00	150.00	11250.00
Enginyer junior	25.00	600.00	15000.00
Tècnic especialitzat	53.00	30.00	1590.00
TOTAL			27840.00

Taula 9.4 Cost total del projecte

Cost de materials	225.29 €
Cost de tècniques de caracterització i màquines de laboratori	3,989.00 €
Cost de personal	27,840.00 €
Total	32,054.29 €
IVA	6,731.40 €
Overhead UPC	5,641.56 €
TOTAL FINAL	44,427.25 €

9.2. Impacte mediambiental i socioeconòmic del projecte

▪ Impacte mediambiental

Les matèries primeres que componen la fase pols dels ciments de fosfat de calci, no duen associat cap cost mediambiental remarcable tenint en compte la naturalesa d'aquests productes (fosfat de calci, hidrogenfosfat de sodi, hidroxiapatita precipitada). En canvi, la fase líquida dels ciments inclou dissolucions aquoses de clorur de cobalt, i aquestes sí mereixen un tractament de residus especial. Les dissolucions de clorur de cobalt no poden entrar en contacte amb el medi aquàtic, ja que són molt tòxiques i poden comportar alteracions genètiques. Per tant, es recullen i s'emmagatzemen a banda per poder tractar-les posteriorment.

Les altres substàncies residu en forma líquida que mereixen especial tractament d'eliminació són els productes que constitueixen el reactiu emprat en la colorimetria. Substàncies com l'aminotiofenol, el blau de metilè i dissolucions aquoses de nitrat de coure, també mereixen un tractament especial d'eliminació.

Com a residus sòlids potencialment perillosos pel medi ambient generats durant el treball, es tenen els ciments presos dopats amb cobalt que van ser rebutjats després dels assaigs. Aquest material de rebuig es va separar dels altres residus sòlids per tractar-lo apart.

En el laboratori del grup d'investigació Bibite es segueix una política molt estricta en la gestió de residus. Es disposa de tota la infraestructura necessària per poder separar les substàncies potencialment perilloses pel medi ambient que s'han anat recol·lectant durant el període d'execució dels assaigs. El laboratori disposa de recipients habilitats per a contenir cada tipus de residu. Periòdicament, l'empresa gestora de residus de la Universitat Politècnica de Catalunya els recull i els hi dóna el tractament adequat d'eliminació per minimitzar al màxim el impacte ambiental.

▪ **Impacte socioeconòmic**

La incidència mundial de trastorns i afeccions òssies ha mostrat una tendència a l'alça abruptament en les últimes dècades, especialment en les poblacions on l'envelliment de la població va acompanyat de l'augment de l'obesitat i l'escassa activitat física. S'estima que només a Europa, cada any, es requereixen més d'un milió d'intervencions com a resposta a trastorns ossis. D'aquestes intervencions, d'un 5 al 10% presenten complicacions associades a manca de reg sanguini, mala aposició de l'os fracturat, interposició de teixit necròtic entre els fragments ossis, immobilització inadequada i infeccions [10].

La cerca de solucions potencials a aquesta problemàtica produeix una gran demanda de materials adequats per a la reparació i regeneració òssia. Des d'aquesta perspectiva, els ciments de fosfat de calci dopats amb cobalt podrien ser un bon material candidat a suplir aquesta demanda en un futur. Un biomaterial osteoinductiu i capaç d'afavorir l'etapa de l'angiogènesi, podria accelerar el procés de curació i regeneració òssia, i podria evitar el fracàs de curació provocat per una vascularització deficient. A més, els ciments de fosfat de calci poden ser injectats, la qual cosa permet practicar tècniques quirúrgiques poc invasives comparades amb les tècniques ortopèdiques tradicionals. A la pràctica, una tècnica quirúrgica poc invasiva, normalment, implica una estada hospitalària i un període de recuperació més curt per al malalt.

Agraïments

En primer lloc, agraeixo sincerament a la Professora Ginebra haver-me donat la possibilitat de realitzar el treball final de carrera amb el seu equip d'investigació en el camp dels biomaterials.

Voldria agrair igualment a Román Pérez les seves explicacions, la seva atenció i dedicació que em va brindar durant el període de temps que vaig poder treballar colze a colze amb ell.

M'agradaria dedicar un especial agraïment a Cristina Canal i Montse Español que em van ensenyar i ajudar en la realització dels últims assajos. A més, agraeixo moltíssim la seva bona disposició i amabilitat en tot moment.

Als meus companys de laboratori i alumnes de doctorat, com Anna Díez i Joanna Sadowska. Un sincer agraïment per la seva ajuda, aclariments, consells i bon humor durant tots aquests mesos.

Finalment, als meus pares per la seva paciència, el seu suport malgrat la distància, i el seu esforç incansable durant tots aquests anys.

A Gemma, la meva germana i amiga per estar sempre allí.

Bibliografia

Referències bibliogràfiques

- [1] Doblaré, M.; García, J.M.; Gómez, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, 2004. 71: 1809–1840
- [2] Rho, J.Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, 1998. 20: 92–102
- [3] Ginebra, M.P. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico- α para aplicaciones quirúrgicas. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 1996. Tesi doctoral presentada a la Universitat Politècnica de Catalunya.
- [4] Imai, Y.; Youn, M.Y.; Inoue, K.; Takada, I.; Kouzmenko, A.; Kato, S. Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases. *Physiological Reviews*, 2013. 93: 481-523
- [5] Torner Pifarré, P. Reparació del teixit ossi mitjançant osteotransducció amb ciment de fosfat càlcic. Barcelona: Universitat de Barcelona, 2001. Tesi doctoral presentada a la Universitat de Barcelona
- [6] Kalfa, I. Principles of bone healing. *Neurosurgical Focus*, 2001. 10:4-12
- [7] Cenni, E. Growth factors in bone repair. *La Chirurgia degli Organi di Movimento*, 2008. 92:161–168
- [8] Einhorn, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998. 355:S7–21.
- [9] Schindeler, A.; McDonald, M.; Bokko, P.; Little, D. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2008. 19: 459–466
- [10] Carano, R.; Filvaroff, E. Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today*, 2003. 8:980-986
- [11] Stegen, S.; Van Gastel, N.; Carmeliet, G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*, 2015. 70:19-27
- [12] Blitterswijk, C.; Thomsen, P. *Tissue engineering*. 1a ed. New York: Academic Press; 2008.

- [13] Urist, MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(698):893–9. 12.
- [14] Giannoudis, P.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone substitutes: An update. *Injury*, 2005. 36:20-27
- [15] Arrington, ED.; Smith, W.J.; Chambers, HG. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedics*, 1996. 329:300-309.
- [16] Banwart, JC.; Asher, MA.; Hassanein, RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: a statistical evaluation. *Spine*, 1995. 20:1055-1060.
- [17] Berven, S.; Tay, BK.; Kleinstueck, FS.; Bradford, DS. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *European Spine Journal*, 2001. 10:S2, 169–77.
- [18] Blokhuis, T.J.; Arts, J.J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury*, 2011. 42:26-29
- [19] Hench, LL. Biomaterials. *Science*, 1980; 208(4446):826-31.
- [20] Navarro, M.; Michiardi, A.; Castaño, O.; Planell, J.A. Biomaterials in orthopaedics. *Interface*, 2008. 5:1137–1158
- [21] George JHS. Engineering of fibrous scaffolds for use in regenerative medicine. Londres: Imperial College of London, 2009. Tesi doctoral presentada al Imperial College of London
- [22] Dorozhkin, S.. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010. 31:1465-1485.
- [23] Chow, LC. Development of self-setting calcium phosphate cements. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. International Edition. 1992. 99: 927-936
- [24] Brown, W.E.; Chow, L.C. Effects of neutral salts in a bench-scale caries model. *Journal of Dental Research*, 1986. 65:1115–1120
- [25] Nomi, M.; Atala, A.; Coppi PD.; Soker, S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Molecular Aspects of Medicine*, 2002. 23:463–83.
- [26] Dimitriou, R.; Tsiridis,E.; Giannoudis, P. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 2003. 36:1392—1404
- [27] Geiger, M. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Advanced Drug Delivery*, 2003. 55:1613–1629
- [28] Tamai, N. et al. (2005) A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous

- hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13:405–417
- [29] Shields, L.B.E. et al. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine*, 2006. 31:542–547
- [30] Boraiah, S. et al. Complications of recombinant human BMP-2 for treating complex tibial plateau fractures: a preliminary report. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2009. 467:3257-3262
- [31] Luca, L. et al. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2- induced ectopic bone formation. *J. Control. Release*, 2010. 147:38-44
- [32] Takeshita, S.; Zheng, LP.; Brogi, E.; Kearney, M.; Pu, LQ.; Bunting, S.; Therapeutic angiogenesis. A single intra arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994. 93:662–70.
- [33] Kim, S.; Von Recum, H.; Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Engineering*, 2008. Part B; 14:133-147.
- [34] Boanini, E.; Gazzano, M.; Bigi, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, 2010 6: 1882–1894
- [35] Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology*, 2013. 31:594-605
- [36] Hoppe, A.; Güldal, N.; Boccaccini, A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 2011. 32: 2757-2774
- [37] Pacary, E. et al. Synergistic effects of CoCl_2 and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuronlike cells. *Journal of Cell Science*, 2006. 119: 2667–2678
- [38] Kim, K.S. et al. A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *Journal of Immunology*, 2006. 177: 7211–7224
- [39] Taylor, A.; Marks, V. Cobalt: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1978. 32:165-177.

- [40] Simonsen, L.O. et al. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. *Science of The Total Environment*, 2012. 432: 210–215
- [41] Patntirapong, S. et al. Effects of soluble cobalt and cobalt incorporated into calcium phosphate layers on osteoclast differentiation and activation. *Biomaterials*, 2009. 30: 548-555
- [42] Dai et al. Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2012, 31:28
- [43] Wu, C. et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2012 33: 2076-2085
- [44] Hoppe, A. et al. Cobalt-Releasing 1393 Bioactive Glass-Derived Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *Applied Materials & Interfaces*, 2014. 6:2865–2877
- [45] Azevedo, M. et al. Hypoxia Inducible Factor-Stabilizing Bioactive Glasses for Directing Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Tissue Engineering*, 2015 Part A 1-2:382-389
- [46] Kulanthaivel et al. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. *Ceramics International*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.05.090>
- [47] Ginebra, M.P.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 2004. 25: 3453–3462
- [48] "Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles", ASTM C266-13, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 04.01: Cement; Lime; Gypsum. West Conshohocken, PA, 2013
- [49] *Mircromeritics AccuPycTM 1330 Pycnometer. Operator's Manual V3.03. Part No. 133-42808-01. January 2005.*
- [50] "Standard Specification for Acrylic Bone Cement", ASTM F451-86, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 13.01: Medical devices; emergency medical services. Philadelphia (1994), 65-71.
- [51] Bandyopadhyay, A.; Bose, S. *Characterization of biomaterials*. Oxford: Elsevier, 2013, p.32-35

- [52] Goldstein, J. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p.689
- [53] Bandyopadhyay, A.; Bose, S. *Characterization of biomaterials*. Oxford: Elsevier, 2013, p.45-46
- [54] Sing, K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces* 2001; 187–188: 3-9
- [55] Beltran, J.L.; Fonrodona, G.; Guiteras, J.; Rubió, R. *Introducció a l'experimentació en química analítica*. 2a ed. Barcelona: Publicacions Universitat de Barcelona, 1995, p.38-41
- [56] Liu, Z.; Jia, X.; Bian, P.; Ma, Z. A simple and novel system for colorimetric detection of cobalt ions. *Analyst*, 2014, 139:585-588
- [57] Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS. A Tutorial for Beginners*. 3a ed. Boca Raton: CRC Press, 2013
- [58] Harris, D. *Análisis químico cuantitativo*. 2a ed. Barcelona: Editorial Reverté, 2001. p.598-608
- [59] Saint-Jean, S.J.; Camire, C.L.; Nevsten, P.; Hansen, S.; Ginebra, M.P. Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted α -TCP cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005. 16:993-1001.
- [60] Pina et al. Newly developed Sr-substituted α -TCP bone cements. *Acta Biomaterialia*, 2010. 6:928–935
- [61] Lilley, K.J.; Gbureck, U.; Knowles, J.C.; Farrar, D.F.; Barralet, J.E. Cement from magnesium substituted hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005;16:455–60.
- [62] Zhang, J.T.; Tancret, F.; Bouler, J.M. Fabrication and mechanical properties of calcium phosphate cements (CPC) for bone substitution. *Materials Science and Engineering C* 2011, 31: 740-747
- [63] Ginebra, M.P.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials* 2004, 25: 3453–3462
- [64] Fowler, B.O.; Moreno, E.C.; Brown, W.E. Infrared spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalciumphosphate. *Arch Oral Biol*. 1966;11:447–92
- [65] Ginebra, M.P. et al. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* 1976, 4:905-912