

Capítulo 3

Estudio de la degradación *in vitro* de vidrios en el sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2

3.1. INTRODUCCIÓN

Dado que el objetivo final de este trabajo es el desarrollo de un material que debe ser reemplazado gradualmente por el tejido óseo, es de gran importancia el estudio del comportamiento de dicho material durante su degradación.

Es un hecho conocido que la biodegradación o reabsorción de un material *in vivo* está constituida por un proceso bastante complejo, donde interactúan mecanismos físico-químicos con mecanismos de tipo biológico a través de procesos mediados por proteínas y células, y por lo tanto, la biodegradación del material no depende exclusivamente de las propiedades físico-químicas del mismo. Sin embargo, no se puede negar que la velocidad de disolución de los materiales juega un papel de gran importancia y que afecta significativamente al comportamiento del material *in vivo*. Así tenemos que, si un material es demasiado soluble, se degradará de forma pasiva en los fluidos fisiológicos sin estimular la remodelación del tejido. Por otro lado, si el material tiene un grado de solubilidad adecuado, se llevará a cabo la reabsorción activa del mismo, es decir, un proceso de reabsorción donde las células interactúan con el material y lideran el proceso de regeneración ósea de una forma más parecida al mecanismo natural o biológico de formación del hueso.

Dentro de este contexto, tanto el control de la cinética de degradación como el comportamiento físico-químico de los materiales durante la degradación constituyen aspectos claves, que deben ser caracterizadas con detalle.

Los vidrios de fosfato de calcio presentan en este sentido una gran ventaja con respecto a los fosfatos de calcio cristalinos, ya que en el caso de los vidrios, existe la posibilidad de controlar con precisión la solubilidad de los mismos mediante la variación gradual de la composición química de éstos. Así, la solubilidad puede ser ajustada modificando proporciones de los modificadores de red, dentro de un amplio rango de composiciones, de forma continua.

En el capítulo anterior, se mencionó la importancia de las características del ión modificador, tales como radio iónico o carga eléctrica, en las propiedades finales del vidrio. Así tenemos que, iones metálicos con un radio iónico grande y una baja carga eléctrica, conllevan a un aumento en la solubilidad del vidrio y una disminución de sus propiedades mecánicas. Mientras que, la incorporación de iones con pequeño radio iónico y carga eléctrica elevada, conllevan a una disminución de la velocidad de disolución del vidrio, así como al aumento de las propiedades mecánicas del mismo.

El efecto de óxidos modificadores como el Na_2O y el CaO , han sido estudiados previamente [1;2]. Aunque la incorporación de estos dos óxidos (Na_2O , CaO) ayuda a controlar la solubilidad y propiedades mecánicas del material, se ha visto en estudios anteriores que para ciertas aplicaciones, como actuar de refuerzo en un material compuesto biodegradable, donde se requiere una estabilidad química a más largo plazo, la solubilidad de vidrios de metafosfato en el sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ continua siendo excesivamente alta. Otros iones modificadores como el Fe^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} y Ti^{4+} , han sido estudiados con el fin de disminuir la velocidad de disolución de los vidrios de fosfato [3-5], entre ellos, el ión Ti^{4+} , como se ha mencionado anteriormente en el capítulo anterior, resultado ser uno de los más efectivos [6].

Por otra parte, según los resultados del capítulo anterior, el TiO_2 ha demostrado ser un ión efectivo para mejorar el comportamiento mecánico de los vidrios de fosfato. Esto se debe principalmente a la mayor reticulación que el ión Ti^{4+} induce, gracias a su alto número de coordinación. Por otro lado, los nuevos enlaces Ti-O-P formados como consecuencia de la incorporación de TiO_2 en el sistema vítreo, tienen una mayor resistencia a la hidrólisis que los enlaces P-O-P . Por lo que es de esperar que la adición de TiO_2 dentro de la red vítrea aumente considerablemente la estabilidad química de los vidrios.

Objetivo

En el capítulo 2, se presentó el desarrollo de diferentes vidrios en el sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 , así como la caracterización de las propiedades fisico-químicas y mecánicas de éstos.

El objetivo de este capítulo es el estudio de la degradación *in vitro* de las tres formulaciones desarrolladas previamente, G3, G5 y G8, tanto en medio acuoso como simulando las condiciones fisiológicas mediante el uso de SBF (*Simulated Body Fluid*) a 37°C. Los cambios experimentados por los diferentes vidrios a lo largo del período de degradación se evalúan mediante microscopía electrónica de barrido ambiental, espectroscopía Raman, ultrasonidos y pérdida de peso de los mismos. También se analiza la liberación de iones al medio utilizando ICP-MS (*Inductively Coupled Mass Spectroscopy*). Al igual que en el capítulo anterior, se utiliza el vidrio G0 como referencia para poder evaluar el efecto de la incorporación del óxido de titanio dentro de la red vítrea.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materiales

3.2.1.1. Vidrios usados

En este estudio se utilizaron los vidrios desarrollados en el capítulo anterior, G0, G3, G5 y G8, los cuales fueron elaborados siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.2.1.1.4.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1 Estudio de disolución de los vidrios en agua destilada

Con el fin de estudiar la velocidad de disolución de los diferentes vidrios, se llevó a cabo el ensayo de disolución de los mismos en agua destilada. Para esto se utilizaron tres muestras de cada vidrio, de 1x1x0,5 cm, cada una pulida con alúmina hasta 0,5 μm por todas sus caras. Cada muestra fue colocada en el fondo de un recipiente de polietileno junto con agua destilada siguiendo una relación superficie/volumen de 1/10, es decir, 10ml de agua por cada cm^2 de muestra.

La disolución de los vidrios fue determinada a partir de mediciones de pérdida de peso de cada muestra, obteniendo así los porcentajes de pérdida de peso según la siguiente ecuación:

$$\%W = \frac{W_0 - W}{W_0} * (100) \quad [3.1]$$

donde W_0 es el peso inicial de la muestra y W es el peso de la muestra a cada período de tiempo.

El estudio fue realizado durante un periodo de 80 días, durante este tiempo las muestras se mantuvieron a 37°C. Tanto el cambio de fluido como las mediciones de peso fueron llevadas a cabo semanalmente. Para ello, las muestras fueron colocadas sobre papel absorbente a temperatura ambiente y posteriormente pesadas hasta la estabilización de su peso, utilizando una balanza de precisión Sartorius BP 211D.

3.2.2.2 Medición de pH durante la disolución

Para el análisis de los cambios de pH a lo largo de la disolución de los vidrios estudiados, se utilizó como medio disolutivo agua destilada. El hecho de que se haya utilizado agua y no SBF se debe a que el SBF es una solución tamponada y como tal podría afectar de forma negativa impidiendo el registro de las fluctuaciones de pH generadas por los vidrios.

Para la obtención del pH durante la disolución, se utilizaron 2 g de partículas de los diferentes tipos de vidrios entre 80 y 150 μm , sumergidos en 200 ml de agua destilada en envases de polietileno a temperatura ambiente. Esta solución se mantuvo en agitación por medio de un agitador Heidolph con hélice de teflón durante el período de duración del ensayo, es decir, 100 horas. Las medidas de pH se realizaron con un electrodo Metrohm® modelo 691 con electrolito KCl-3M el cual se conectó a un PC para registrar de esta forma los valores del pH de la solución en forma continua a intervalos regulares de tiempo (cada 60 segundos) a lo largo del ensayo.

3.2.2.3 Determinación de la liberación de iones al medio

Dado que los vidrios estudiados son solubles, es de gran interés determinar la concentración de iones liberados al medio. Más aún, cuando se trata de materiales que serán implantados dentro del cuerpo humano. Por ello se llevó a cabo la evaluación de las concentraciones de los iones Ca, P, Na y Ti durante la disolución de los vidrios en agua destilada a 37°C usando la técnica de espectroscopía de masa de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy*).

ICP-MS es una técnica que se basa en la vaporización, disociación y ionización de los diferentes elementos químicos que se encuentran en el interior de un plasma. Los iones positivos generados durante este proceso son separados en función de su relación masa/carga y finalmente son detectados con un sistema multiplicador de iones. Esta técnica tiene la capacidad de realizar análisis elementales a nivel de trazas y ultratrazas.

El ensayo se llevó a cabo con pequeños bloques de vidrio de aproximadamente 15x15x5 mm, los cuales fueron pulidos por todas sus caras hasta 0,5 μm con partículas de alúmina. Cada muestra de vidrio fue colocada en un envase de polietileno y sumergida en agua destilada manteniendo una relación superficie/volumen de 1 $\text{cm}^2/10 \text{ ml}$, a una temperatura de 37°C. Se estudiaron dos muestras para cada tiempo estudiado, es decir, 48, 168, 336 y 500 horas.

Las muestras fueron sumeridas en agua destilada, y el fluido no fue renovado durante los diferentes períodos de estudio. Una vez transcurridos los períodos de tiempo estipulados, se retiraron las muestras del agua destilada y el fluido fue recuperado para la preparación de las muestras para el análisis por ICP. Para el análisis se tomó el fluido recuperado y se prepararon disoluciones 1:2 con una solución de agua desionizada al 10% HNO_3 . Finalmente, se realizó el análisis de cada muestra por triplicado.

3.2.2.4 Estudio de la solubilidad en medio fisiológico

En este caso, se utilizó como medio disolutivo un medio fisiológico conocido como SBF (*Simulated Body Fluid*), a 37°C que corresponde a la temperatura corporal.

El SBF es una solución acelular y aprotéica, la cual fue desarrollada por Kokubo [7] con la finalidad de simular *in vitro* las reacciones a nivel superficial que se generan *in vivo* entre la superficie de una biocerámica y su entorno, es decir, el tejido que la rodea. Este fluido fisiológico simulado presenta una composición iónica muy similar al plasma sanguíneo. La composición del SBF se muestra en la Tabla 3.1 donde a su vez se comparan las concentraciones iónicas de éste y del plasma sanguíneo. La diferencia principal entre éstos reside en el hecho de que el SBF es un medio acelular y aprotéico como se dijo anteriormente. Además se puede observar en la Tabla 3.1 que a pesar de que la concentración de la mayoría de los iones constituyentes tanto del SBF como del plasma sanguíneo son similares, existen algunas diferencias en los iones cloro y carbonato. Los iones carbonato presentan un nivel menor y los iones cloro un nivel mayor en el SBF que en el plasma.

Tabla 3.1**Composición iónica (mM) del SBF y del plasma sanguíneo [7].**

Ión	SBF	Plasma Sanguíneo
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0

Actualmente una de las principales aplicaciones que presenta este fluido es la evaluación de la bioactividad de un material. Es decir, la utilización del SBF, permite estudiar la capacidad que tiene un material determinado, para formar una capa de hidroxiapatita (o de alguno de los fosfatos de calcio afines con la fase mineral del hueso), en la superficie del mismo, de forma tal que estimule la unión con el tejido óseo. Sin embargo, las diferencias observadas en las concentraciones de los iones Cl⁻ y HCO₃⁻ deben ser tomadas en cuenta ya que podrían afectar de forma significativa en la bioactividad del material.

Para la elaboración del SBF se mezclaron en 500 ml de agua destilada los reactivos mostrados en la Tabla 3.2 según el protocolo descrito en [8]. Se añaden uno a uno los reactivos siguiendo el orden que aparece en la Tabla y esperando a que se disuelva completamente uno para incorporar el siguiente. La solución obtenida se lleva a un pH de 7,25 a 36,5°C mediante la adición de ácido clorhídrico 1M o trishidroximetilaminometano (NH₂C(CH₂OH)₃) y se le agrega agua destilada hasta completar 1l de solución.

Tabla 3.2**Reactivos utilizados para la elaboración del SBF**

Orden	Reactivo	Cantidad (g)
1	NaCl	7.996
2	NaHCO ₃	0.350
3	KCl	0.224
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.228
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.305
6	1M-HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0.278
8	Na ₂ SO ₄	0.074
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6.057

3.2.2.4.1. Cinética de disolución

Para determinar la velocidad de disolución de los vidrios en SBF a 37°C, se realizaron mediciones de pérdida de peso siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.1 de este capítulo. En este caso las muestras fueron esterilizadas previamente con UV dentro de una campana de flujo laminar, 2 horas por cada cara. El fluido fue filtrado con filtros de porosidad 0.22 µm *Sterivex*TM de la casa Millipore® para evitar cualquier tipo de impurezas o contaminación bacteriana en el medio.

3.2.2.5 Estudio de los cambios morfológicos superficiales de los vidrios durante la disolución

La evolución de la morfología de la superficie de los materiales fue analizada por medio de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, *Environmental Scanning Electron Microscopy*), utilizando un microscopio *Electroscan Ö2020*. Esta técnica permite la observación de las muestras en estado húmedo, con lo cual es posible realizar un seguimiento detallado de la degradación superficial de un espécimen en particular a través del tiempo, introduciéndola nuevamente en el medio de disolución después de observarla, ya que no es necesario el recubrimiento de las muestras con una capa conductora de oro o carbono.

Para cada tipo de vidrio se prepararon muestras según el método descrito en la sección 2.2.1.1.5 y se colocaron en disolución en SBF a 37°C al igual que las muestras destinadas a los estudios de pérdida de peso señaladas en el apartado anterior. Cada dos semanas se retiraron del medio y se observó la superficie del vidrio mediante ESEM.

3.2.2.6 Determinación del módulo de Young a lo largo del proceso de disolución

Para la determinación del módulo de Young se utilizó la técnica de ultrasonidos mencionada anteriormente en el apartado 2.2.2.4. Se usaron bloques de vidrio de aproximadamente 15x15x5mm los cuales fueron sumergidos en SBF a 37°C.

Cada 3 semanas se realizó la medición del módulo por un período de disolución de 15 semanas. Debido a que los ultrasonidos son una técnica no destructiva, se pudo utilizar el mismo espécimen a lo largo de todo el período, lo cual permitió observar la evolución del módulo elástico de una misma muestra.

3.2.2.7 Espectroscopía Raman. Cambios estructurales durante la degradación

Los cambios estructurales del vidrio G5 durante su disolución en SBF a 37°C fueron determinados por medio de espectroscopía Raman siguiendo las mismas condiciones presentadas en la sección 2.2.2.6. Para ello se tomó un bloque de vidrio de aproximadamente 15x15x5mm, el cual se sumergió en SBF a 37°C al igual que en los ensayos anteriores. El fluido fue cambiado semanalmente y después de 3, 6, 9, 12 y 15 semanas de inmersión, se analizó la superficie de las muestras por medio de espectroscopía Raman.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterización de la cinética de disolución en agua destilada

La Figura 3.1 muestra las diferentes curvas de pérdida de peso en agua destilada, correspondientes a las 3 composiciones de vidrio estudiadas modificadas con titanio, además del vidrio G0, el cual no contiene TiO₂ que se ha tomado a modo de control, al igual que en los casos anteriores para comparar el efecto de la incorporación del óxido de titanio. En la gráfica se muestra el porcentaje de pérdida de peso calculado según la ecuación [2.1] en función del tiempo de degradación, hasta un máximo de 80 días. Se puede notar que la solubilidad de estos vidrios disminuye a medida que aumenta el contenido de TiO₂. Después de 80 días de inmersión en agua destilada a 37°C, la serie G3 presentó una pérdida de peso del 2.5%, las series G5 y G8 presentaron una pérdida de alrededor del 1% y el vidrio sin titanio (G0) experimentó una pérdida de peso de más del 11%.

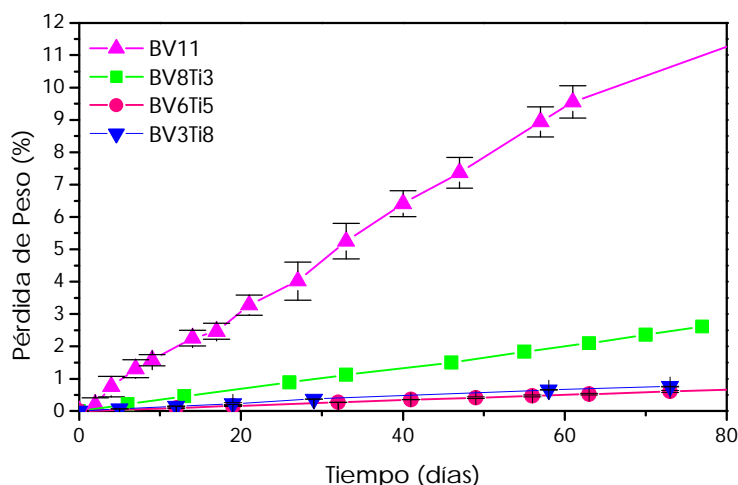


Figura 3. 1. . Pérdida de peso en función del tiempo de disolución para los diferentes vidrios durante la degradación en agua destilada a 37°C (las barras de error no se muestran en caso de ser más pequeñas que los símbolos).

Además se puede observar que las diferentes composiciones de vidrio siguen una tendencia lineal con respecto al porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo de disolución. Gracias al comportamiento lineal descrito por las gráficas de la Figura 3.1, es posible calcular por medio de la pendiente la velocidad de disolución de cada una de las formulaciones estudiadas. Estos valores se encuentran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3

Velocidad de disolución de los vidrios estudiados en agua destilada a 37°C (Media ± Desviación Estándar, n=3).

Vidrio	Velocidad de disolución en agua destilada (gr/cm ² h)
G0	$1,77 \times 10^{-5} \pm 4,32 \times 10^{-6}$
G3	$6,26 \times 10^{-6} \pm 2,01 \times 10^{-8}$
G5	$3,13 \times 10^{-6} \pm 1,38 \times 10^{-7}$
G8	$2,18 \times 10^{-6} \pm 1,05 \times 10^{-7}$

Los resultados corroboran el efecto de la composición química de estos materiales en la velocidad de disolución de los mismos. El vidrio G0 resultó tener la velocidad de

disolución más alta. En el caso de los vidrios con TiO_2 se observó una disminución en la velocidad de disolución al aumentar la cantidad de titanio incorporado.

3.3.2. Evaluación de los niveles de pH

La Figura 3.2 muestra la evolución de los valores de pH durante un período de 100 horas, es decir, durante 4 días aproximadamente, en agua destilada a 37°C .

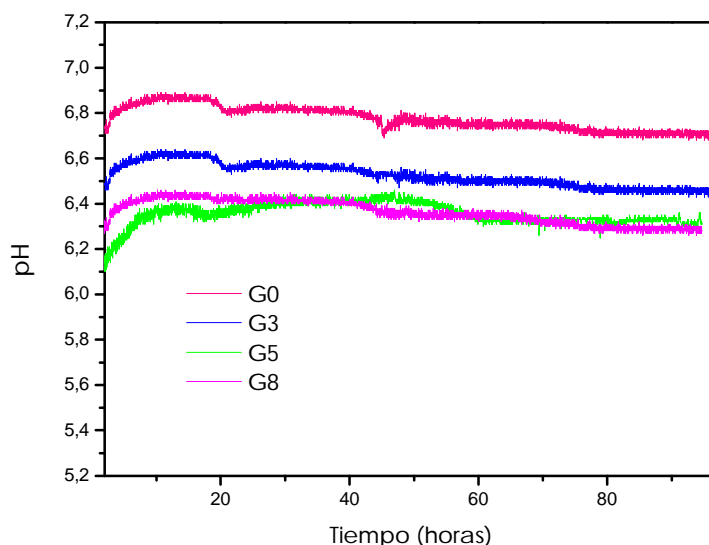


Figura 3. 2. Evolución de los niveles de pH del medio durante la disolución en agua destilada de los distintos vidrios (G0, G3, G5 y G8).

En primer lugar se observa que el pH del fluido sufre importantes variaciones a tiempos cortos, casi inmediatamente después de introducir las partículas de vidrio en el agua. Transcurridas unas 10 horas de disolución, los niveles de pH tienden a la estabilización. Sin embargo, a pesar de la aparente estabilización, se nota una ligera tendencia a la disminución del pH con el tiempo de disolución.

Todos los vidrios se estabilizaron en un rango de pH comprendido entre 6,4 y 6,74 aproximadamente. Se observó una relación directa entre la velocidad de disolución y el pH durante el período de tiempo estudiado, a pesar de que las diferencias de los valores de pH entre los diferentes vidrios no fueron muy pronunciadas. Así, dentro del rango de pH obtenido se observa que G0, el más soluble de los vidrios, tiene un pH ligeramente más alto que los demás, seguido por el G3 y por último el G5 y el G8, los cuales mostraron tendencias bastante similares al igual que en el caso de las curvas de solubilidad.

3.3.3. Liberación de iones al medio

La Figura 3.3 muestra la evolución de la liberación de los iones Ca, P, Na y Ti en agua destilada a lo largo de un período de 500 h de inmersión para los tres vidrios con titanio (G3, G5 y G8). Se observa en dicha figura que los niveles de concentración de los diferentes iones aumentan con el tiempo de inmersión y que además están directamente relacionados con la solubilidad de cada vidrio. Además, parece que el vidrio más soluble de los tres, el G3, alcanza un valor de saturación más rápidamente que los otros dos vidrios menos solubles.

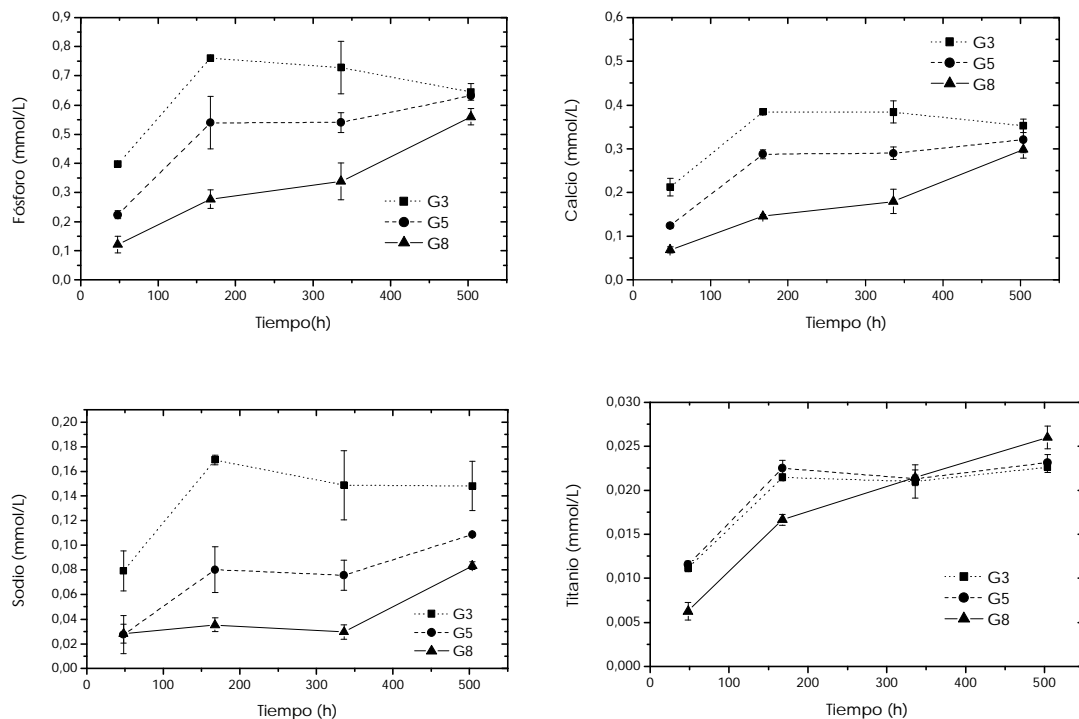


Figura 3.3. Análisis de la liberación de iones P, Ca, Na y Ti en función del tiempo de disolución (500h), para los vidrios G0, G5 y G8.

En el caso del sodio, el vidrio G3 que es el vidrio con mayor porcentaje de Na_2O y también el más soluble, presentó los mayores niveles de liberación del ión, seguido por el vidrio G5 y el G8.

La liberación de titanio resultó ser un poco más compleja. Tanto el vidrio G3 como el G5 que son los vidrios con menor porcentaje del ión presentaron valores similares. El vidrio G8, que posee el mayor contenido de titanio pero es el vidrio menos soluble,

presentó inicialmente los niveles más bajos de titanio en el medio y después de 350 h sufrió un aumento con respecto a los vidrios G3 y G5. Por lo que, a largo plazo fue el vidrio que presentó una mayor liberación de titanio.

Por otro lado, los valores de la relación molar $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ en solución no presentaron cambios significativos durante el período de disolución como se encuentra ilustrado en la Figura 3.4. Los valores permanecieron entorno a una relación molar $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ de 0,9 aproximadamente, la cual es un poco inferior a la del vidrio sólido, que es 1.

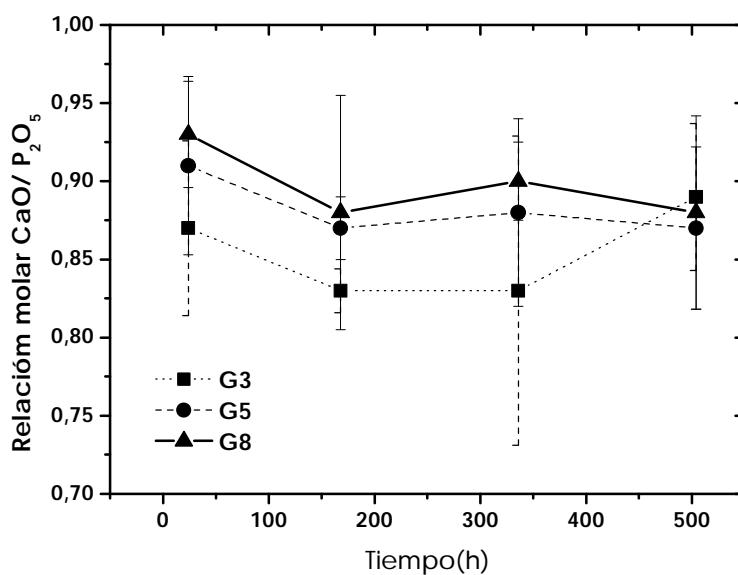


Figura 3. 4. Evolución de la relación molar $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ en función del tiempo de disolución (500 horas) para los diferentes vidrios estudiados.

3.3.4. Velocidad de disolución en SBF

En la Figura 3.5 se encuentran graficadas las curvas de pérdida de peso en SBF a 37°C de los vidrios G0, G3, G5 y G8. Como era de esperar, los vidrios a los cuales se les incorporó TiO_2 dentro de la red vítrea resultaron ser menos solubles que el vidrio G0. De hecho, la pérdida de peso de los vidrios se redujo notablemente con la incorporación de tan solo un 3% molar de TiO_2 . Después de 16 semanas (112 días) de disolución en SBF a 37°C , se observó una pérdida de peso alrededor de 0,6% para el vidrio con un 3% molar de TiO_2 , y de menos de un 0,5 y 0,3% para los vidrios que

contenían 5 y 8% molar de óxido de titanio respectivamente, mientras que G0, el vidrio sin titanio, presentó una pérdida del 1,6% después de 6 semanas de disolución.

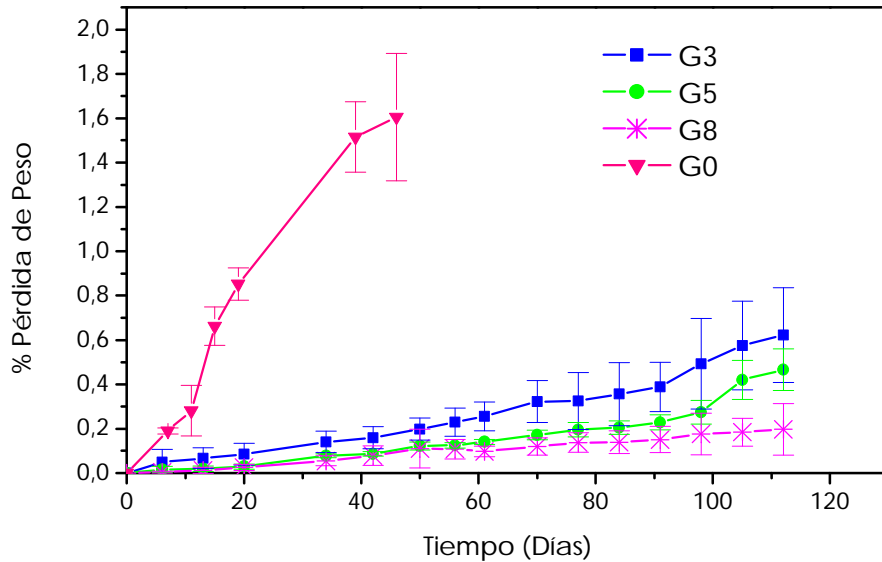


Figura 3. 5. Pérdida de peso en función del tiempo de degradación para los diferentes vidrios en SBF a 37°C .

Se observó que los vidrios G3 y G5 siguieron una tendencia lineal hasta 70 días de disolución. Mientras que el G8 mantuvo el comportamiento lineal a lo largo del período completo de degradación. Gracias a esto, se pudo calcular la velocidad de disolución de cada uno de los vidrios a partir del tramo lineal de dichas curvas. En la Tabla 3.4 se encuentran los valores correspondientes a la velocidad de disolución en SBF de cada uno de los vidrios estudiados.

También se puede ver que en la etapa inicial del estudio (de 0 a 70 días), el efecto del TiO_2 en la estabilidad química es más pronunciado si se comparan los vidrios con 3 y 5% de TiO_2 , que si se comparan los vidrios con 5 y 8% del óxido, ya que al igual que en el caso del agua destilada, estos tienen una pérdida de peso bastante similar. Sin embargo, después de 70 días de disolución, G5 mostró un mayor incremento en la pérdida de peso que el vidrio G8, y siguió una tendencia similar a la del G3, el vidrio con 3% de TiO_2 .

Tabla 3.4**Velocidad de disolución de los diferentes vidrios en SBF a 37°C. (Media ± Desviación Estándar, n=3).**

Vidrio	Velocidad de disolución en SBF (gr/cm ² h)
G0	$3.10 \times 10^{-06} \pm 7,02 \times 10^{-07}$
G3	$6.57 \times 10^{-07} \pm 1,21 \times 10^{-07}$
G5	$3.2 \times 10^{-07} \pm 1,03 \times 10^{-07}$
G8	$3.25 \times 10^{-07} \pm 8,63 \times 10^{-08}$

3.3.5 Degradación superficial

La observación de las diferentes muestras por medio de ESEM durante el período de degradación reveló la presencia de importantes diferencias en la superficie de los vidrios inmersos en SBF a 37°C, lo cual se muestra en la Figura 3.6. En dicha figura se observa que para un mismo período de tiempo, el vidrio sin titanio (G0) mostró una superficie mucho más degradada que el resto de los vidrios estudiados. Después de 4 semanas de disolución, se observaron numerosas picaduras en la superficie de la muestra, mientras que en los vidrios G3, G5 y G8, con diferentes porcentajes de TiO₂, tan sólo se observaron algunas líneas correspondientes al proceso de pulido, debido a la degradación del material.

En la Figura 3.7, se puede ver el proceso de degradación superficial experimentado por los vidrios con óxido de titanio a los diferentes períodos de inmersión en SBF. Se ve que después de 7 semanas los signos de degradación superficial son más evidentes (Fig. 3.7 a ,d, g). Se observa claramente la presencia de numerosas picaduras en el caso del vidrio G5, y la ruptura de la capa hidratada formada en la superficie en el caso del vidrio G3. Sin embargo, para el mismo período de tiempo, el vidrio menos soluble, es decir, el G8, tan sólo presentó la formación de líneas más profundas que tienen su origen en el pulido.

Las imágenes de la degradación superficial obtenidas en la décima semana de inmersión en el fluido se encuentran en las Figuras 3.7 (b, e y h). En este período de tiempo se observa el desprendimiento de la capa superficial en forma de delgadas láminas. Esto se ve claramente en la Figura 3.7 (e y h) donde se observa para los vidrios G5 y G8, la formación de pequeños mosaicos y su posterior desprendimiento.

Al final del estudio, esto es, después de 16 semanas de disolución (ver Figuras 3.7 c ,f, i) los vidrios de las distintas formulaciones mostraron la formación de numerosos agujeros y surcos distribuidos en toda la superficie debidos al desprendimiento de la capa superficial.

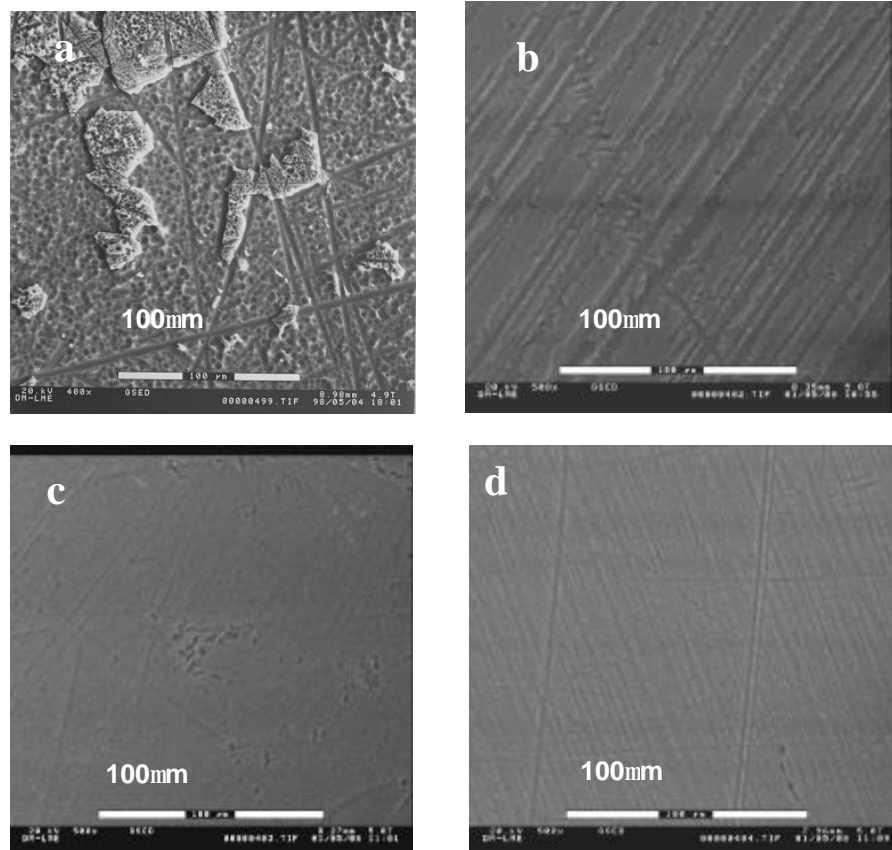


Figura 3. 6. Superficie de los diferentes vidrios después de 4 semanas de degradación en SBF a 37°C, a) G0; b) G3; c) G5 y d) G8.

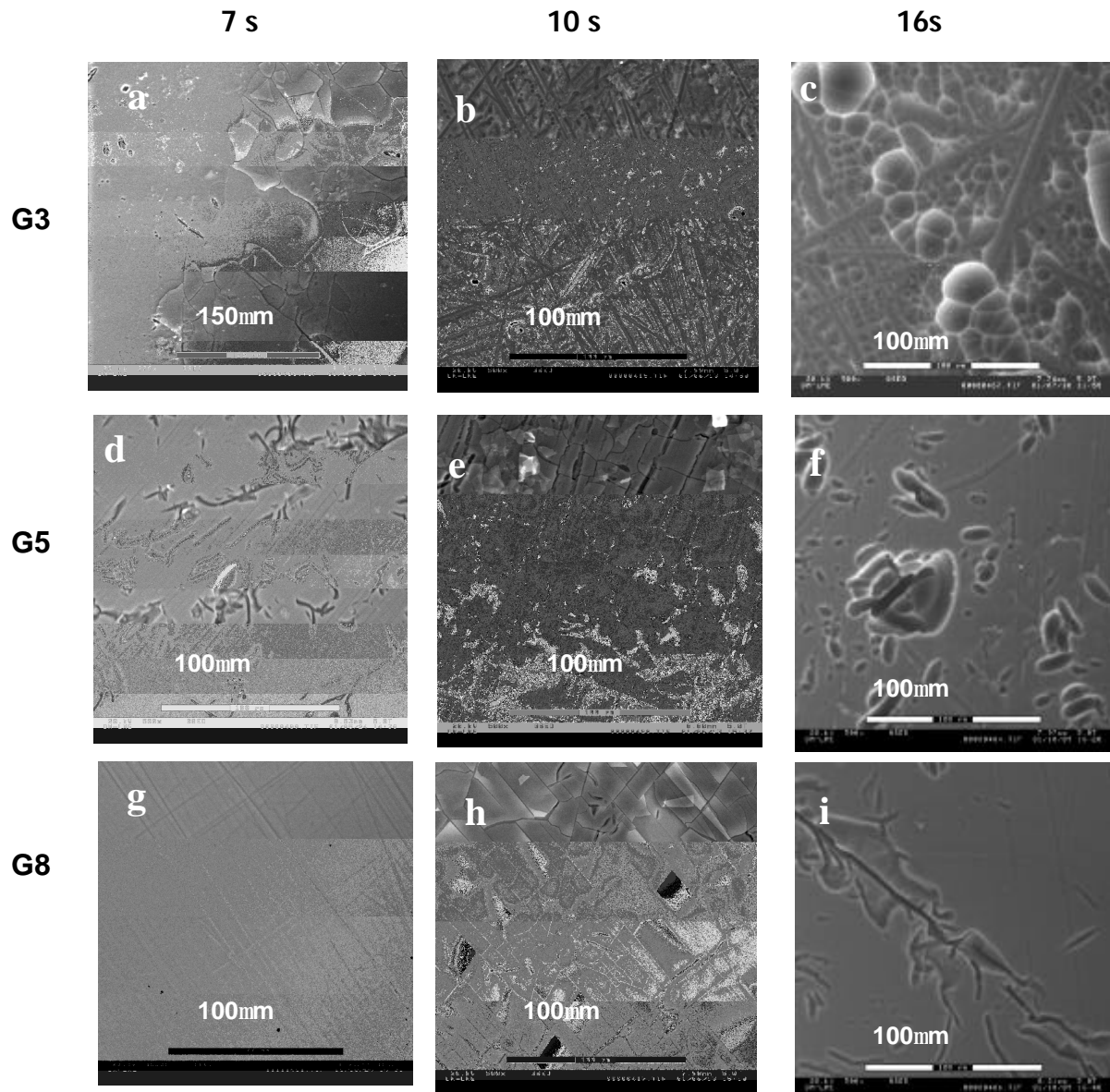


Figura 3. 7. Morfología de la superficie de los diferentes vidrios estudiados después de diferentes períodos de degradación en SBF. a) G3 después de 7 semanas; b) G3, 10 semanas; c) G3, 16 semanas; d) G5, 7 semanas; e) G5, 10 semanas; f) G5, 16 semanas; g) G8, 7 semanas; h) G8, 10 semanas e I) G8, 16 semanas.

3.3.6. Cambios estructurales

En el capítulo anterior se mostraron los espectros Raman correspondientes a cada uno de los vidrios estudiados en su estado original. En la Figura 3.8 se muestra la evolución de la estructura del vidrio G5, con 5% molar de TiO_2 , durante el período de degradación estudiado. Se muestra sólo la evolución del vidrio G5 ya que los vidrios G3 y G8 tienen un comportamiento similar a lo largo de su degradación. En dicha figura se observa que las principales bandas características de este vidrio de fosfato de

calcio [9-11], permanecieron presentes a través del tiempo de inmersión en SBF. También se observa que las intensidades relativas de cada una de las bandas dentro de cada espectro se mantuvieron sin cambios, lo que significa que la estructura de los vidrios no sufrió cambios durante el período de inmersión en SBF.

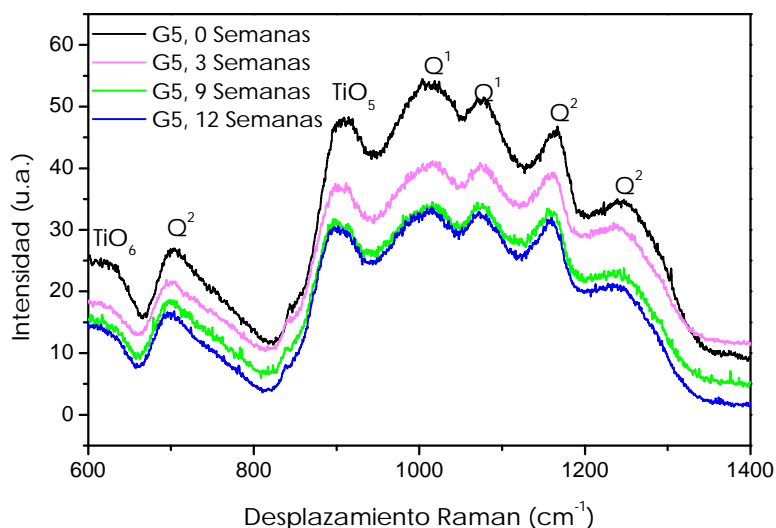


Figura 3. 8. Espectros Raman del vidrio G5 después de 0, 3, 9 y 12 semanas de disolución en SBF a 37°C. Las bandas principales están resaltadas.

Por otro lado, se observa en dicha figura, que la intensidad de los espectros disminuyó a medida que aumentó el tiempo de disolución. Como hemos visto en la Figura 3.7, durante la degradación del vidrio, se formó una capa superficial la cual, se rompió en múltiples trozos y en algunos casos se superpusieron unos sobre otros, formando una superficie irregular. Es posible que las irregularidades en la superficie hayan afectado en la obtención de la señal Raman y debido a esto haya disminuido.

Por otra parte, en la Figura 3.9 se muestran los espectros Raman correspondientes a los vidrios G0 y G5 antes y después de la disolución en SBF a 37°C. Se observa que en el caso del G0, es decir, el vidrio sin TiO₂, el proceso de disolución afectó de forma considerable la estructura de la superficie del material. Después de 9 semanas de inmersión en SBF, se observó la aparición de una nueva banda a 960 cm⁻¹ la cual corresponde a unidades Q⁰, es decir, grupos ortofosfatos (PO₄), el aumento significativo de la banda situada cerca de 1030 cm⁻¹ (grupos Q¹), y la notable disminución en intensidad de las bandas que se encuentran a 690 y 1170 cm⁻¹ atribuidos a grupos Q². En contraste, el espectro del vidrio G5 se mantuvo casi intacto después de la 9 semanas de degradación y tan sólo se observó una pequeña disminución en la intensidad de las bandas del espectro.

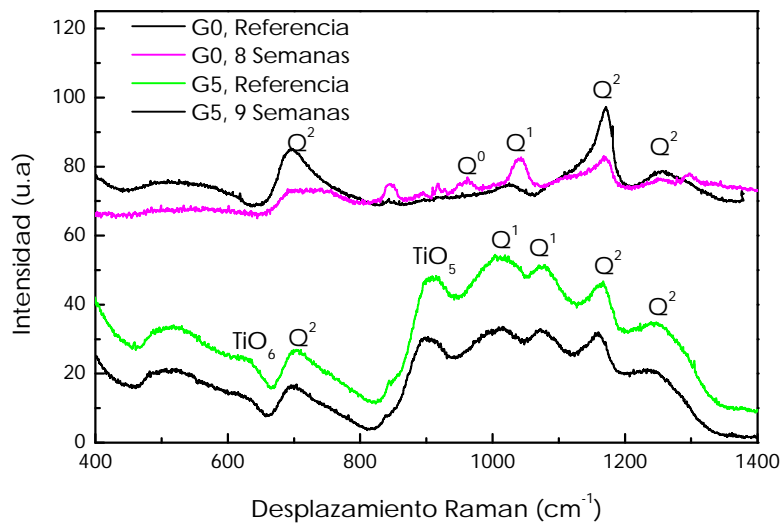


Figura 3. 9. Espectros Raman de los vidrios G0 y G5 antes de la degradación y después de 9 semanas de disolución. Las bandas principales están resaltadas.

3.3.7. Evolución del módulo elástico

En el capítulo precedente se mostraron los valores correspondientes al módulo elástico de cada uno de los vidrios estudiados. En este capítulo se ha realizado un seguimiento de la evolución del módulo de cada uno de los especímenes a través del tiempo de degradación. En la Figura 3.10 se muestran las gráficas correspondientes a los valores del módulo en función del tiempo. Se observa que tanto para el vidrio sin titanio, G0, como para los vidrios con diferentes porcentajes de TiO_2 , G3, G5 y G8, el módulo elástico disminuyó después de las primeras 3 semanas de inmersión en SBF, y luego permaneció casi constante hasta las 15 semanas de degradación en SBF a 37°C.

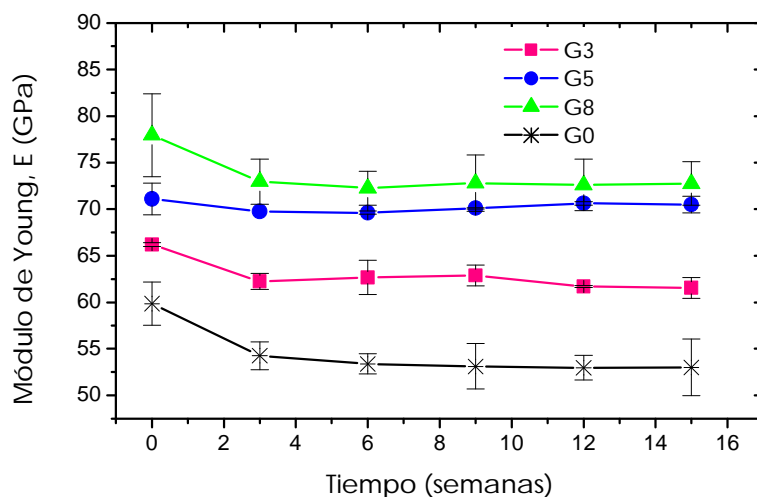


Figura 3. 10. Evolución del módulo de Young de los tres vidrios con Ti y el vidrio G0 durante el período de disolución en SBF a 37°C (barras de error no mostradas en caso de ser más pequeñas que los símbolos).

3.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se han analizado los mecanismos de disolución de los diferentes vidrios de metafosfato según los porcentajes de pérdida de peso, los cambios estructurales, los cambios morfológicos superficiales, la liberación iónica al medio y la evolución de las propiedades mecánicas que han sufrido cada uno de los especímenes durante el período de degradación.

Los resultados de pérdida de peso obtenidos a partir del test de solubilidad, mostraron que la disolución de los vidrios de metafosfato se ve afectada por la composición química del vidrio. Este hecho puede observarse claramente en las Figuras 3.1 y 3.5 donde el vidrio sin TiO_2 resultó ser entre 8 y 10 veces más soluble que los vidrios que contenían entre un 3 y un 8% molar de TiO_2 . Este aumento de la estabilidad química de los vidrios estaría probablemente relacionado con los cambios estructurales generados por la incorporación de iones Ti dentro de la red vítrea. Estos cambios pueden verificarse en los espectros Raman mostrados en el capítulo anterior (Figura 2.7). La incorporación de titanio conlleva el cambio de grupos Q^2 a grupos Q^1 , que son grupos terminales [12].

Los vidrios estudiados en este capítulo, parten de una relación $[\text{O}]/[\text{P}]=3.12$ (vidrio G0), y alcanzan una relación $[\text{O}]/[\text{P}]=3.21$ con la incorporación de 8% molar de TiO_2 . Day *et al* [13] demostraron que la relación Oxígeno/Fósforo $[\text{O}]/[\text{P}]$ es de gran

importancia para la durabilidad química de los vidrios. Según Day, la durabilidad química tiende a ser máxima cuando la relación $[O]/[P]$ es igual a 3.5. A su vez, la velocidad de disminución de la estabilidad química es más rápida cuando la relación $[O]/[P]$ disminuye por debajo de 3.5 (la estructura se mueve hacia los grupos metafosfato), que cuando $[O]/[P]$ aumenta por encima de 3.5 (la estructura se mueve hacia los grupos ortofosfato). Al incorporar TiO_2 dentro del sistema, la relación $[O]/[P]$ aumenta, acercándose a 3.5 y como consecuencia, la solubilidad disminuye.

En el presente trabajo, se observó un mecanismo de disolución de dos etapas en el caso de la disolución en SBF. Una primera etapa lineal de disolución lenta y una segunda etapa con un aumento en la velocidad de pérdida de peso del vidrio. El vidrio G0, el más soluble, presentó el cambio de comportamiento de la primera a la segunda etapa al inicio del período de disolución, esto es alrededor de los 12 días. En el caso de los vidrios con 3 y 5% molar de TiO_2 , no se observó este cambio de comportamiento hasta alrededor de los 90 días para el G3 y 100 días para el G5. Por lo que se observó un retraso en la transición de la primera a la segunda etapa al incrementar el contenido de TiO_2 en el sistema vítreo. El vidrio G8, el menos soluble, mantuvo un comportamiento lineal a lo largo de todo el período de estudio. Sin embargo, teniendo en cuenta la tendencia descrita al aumentar el contenido de TiO_2 , es posible que presente este mismo comportamiento de dos etapas después de un período de degradación mayor.

Otro punto importante en el estudio de la cinética de disolución de estos vidrios es el tipo de fluido utilizado, ya que como se ha podido observar, la fuerza iónica del medio tiene un efecto importante en la velocidad a la cual se disuelven los vidrios. En el caso particular de este estudio, según los valores mostrados en las Tablas 3.3 y 3.4, los vidrios con TiO_2 mostraron ser 10 veces más solubles en agua destilada que en SBF. Este hecho puede ser atribuido a dos factores diferentes. En primer lugar, en agua hubo un leve descenso en los niveles de pH durante el período completo de degradación de los vidrios (16 semanas), mientras que en SBF el pH se mantuvo constante ya que es una solución tamponada. Se ha demostrado que este tipo de vidrios de fosfato sufre un incremento notable en la velocidad de degradación al estar en contacto con medios ácidos [14]. Por lo tanto, al ser el SBF una solución tamponada, evita la formación en el medio de protones (acidificación) que ataquen los enlaces P-O-Ti y consecuentemente no favorece la degradación del material. En segundo lugar, debido a que el SBF es una solución saturada con respecto a los diferentes iones presentes en el vidrio, la fuerza iónica en el SBF es menor que en el agua destilada, lo cual conlleva a una disminución en el proceso de difusión o liberación de iones al medio.

Por otro lado, se observa en las Tablas 3.3 y 3.4 que tanto el vidrio con 5% molar de TiO_2 como el vidrio con 8% molar del óxido, presentaron una velocidad de disolución

muy similar. Esto podría atribuirse al hecho de que a pesar de que el ión Ti crea numerosos enlaces entre las diferentes cadenas y conlleva a una mejoría bastante notable de la estabilidad del material, a medida que la fracción de titanio en el vidrio se incrementa; las cadenas de fosfato tienen un número limitado de posiciones para acomodar a los iones dentro de la red formando enlaces entre cadenas debido a causas estéricas. Por lo tanto, la eficiencia de los iones Ti para incrementar la estabilidad del vidrio pareciera tener un límite de saturación. Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por Brow *et al.* para vidrios de titanofosfato de calcio [15].

Los análisis por ICP, también han revelado información importante con respecto a los mecanismos de degradación. Las Figuras 3.3 y 3.4 muestran la liberación de cada uno de los iones durante el tiempo de estudio así como la evolución de la relación molar $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ durante este mismo tiempo. Los resultados de los análisis sugieren que la disolución del vidrio se lleva a cabo de una manera uniforme y congruente sin que ocurra la liberación selectiva de alguno de los iones. Además, la relación molar $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ así como la relación $\text{Na}_2\text{O}/\text{P}_2\text{O}_5$ detectadas en la solución no tuvieron variaciones significativas durante el período completo de disolución y se mantuvieron relativamente constantes y cercanas a las relaciones molares $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ y $\text{Na}_2\text{O}/\text{P}_2\text{O}_5$ iniciales de la formulación química de los vidrios lo que indicaría una disolución congruente del vidrio. Sin embargo, en el caso de la relación $\text{TiO}_2/\text{P}_2\text{O}_5$, la relación se mantuvo constante con el tiempo, pero fue entre 4 y 5 veces menor que la esperada. Esto puede atribuirse al hecho de que los enlaces Ti-O-P son más resistentes a la hidrólisis que los enlaces P-O-P [15].

Con respecto a las observaciones realizadas mediante ESEM, vemos en las diferentes figuras que a pesar de que el vidrio G0 mostró una velocidad de disolución mayor que la de los vidrios con TiO_2 , el mecanismo de degradación superficial parece ser muy similar en ambos casos. La adición de titanio en la red vítrea parece tener tan sólo un efecto retardante en el proceso de degradación. A tiempos cortos, las imágenes de ESEM mostraron la formación de una superficie algo corroída la cual presenta varias picaduras que se originaron preferencialmente a partir de los defectos de pulido. A períodos mayores, se observó la presencia de pequeñas piezas o mosaicos constituidos por la superficie del vidrio, que en muchos casos se despegó del cuerpo del vidrio en forma de capa hidratada. Después de 16 semanas de disolución, que fue el mayor período de tiempo estudiado, la superficie de los diferentes vidrios mostraron grandes surcos y agujeros, de tamaño mayor que los vistos después de 10 semanas de degradación, lo cual sugiere que el mecanismo de degradación es un proceso cíclico donde las cadenas de fosfato más externas que se encuentran localizadas en la superficie del material, están expuestas constantemente a un proceso de hidratación y posteriormente de hidrólisis mediado por los protones H^+ presentes en el medio acuoso.

Como ya se ha dicho, las curvas de pérdida de peso para los vidrios estudiados presentaron dos etapas, la primera con una velocidad de degradación lenta y la segunda con una velocidad de degradación más rápida. En 1984 Bunker *et al* [16] propusieron un modelo para la cinética de disolución de los vidrios de fosfato. Este estudio propone que la cinética de disolución de estos vidrios está constituida por dos etapas, una etapa inicial donde la pérdida de peso es proporcional a $t^{1/2}$, y una segunda etapa donde la disolución tiene un comportamiento lineal con el tiempo. Los resultados obtenidos en este capítulo no están de acuerdo con la cinética propuesta pero si con el mecanismo de degradación propuesto por Bunker *et al*. Según el mecanismo propuesto, la primera etapa del proceso de degradación, es decir, la etapa más lenta, está controlada por la difusión del medio acuoso hacia la superficie del vidrio. El proceso de difusión tiene lugar hasta que las cadenas de fosfato están completamente rodeadas por las moléculas de agua. La segunda etapa tiene lugar cuando las cadenas de fosfato hidratadas se separan de las cadenas parcialmente hidratadas que aún se encuentran unidas a la superficie del material.

En nuestro caso, la curva de pérdida de peso del vidrio G3 mostró un cambio de pendiente a partir de 70 días (10 semanas). Estos resultados coinciden con las imágenes de ESEM de la superficie del material después de 10 semanas de degradación, donde se observa la separación de la capa hidratada en el caso del G3. Las micrografías de los vidrios G5 y G8 adquiridas después del mismo período de degradación (10 semanas) mostraron que en el caso del G5 algunos de los trozos de la capa hidratada estaban separados de la superficie del vidrio, pero otros continuaban aún unidos, y en el caso del vidrio G8 se observó que la capa hidratada se encontraba dividida en varios trozos pero aún no se había separado por completo de la superficie.

Es posible que la coincidencia entre las micrografías obtenidas después de 10 semanas y la curva de pérdida de peso del vidrio G3 este relacionada con el mecanismo de degradación descrito por Bunker *et al* [16] y Delahaye *et al* [14]. En el caso de los vidrios G5 y G8 esta situación no se observó con claridad ya que según la curva de pérdida de peso, después de 10 semanas de degradación estos vidrios aún no han llegado al punto de cambio de pendiente de la curva que indica la liberación de la capa hidratada.

Por lo tanto, tanto los resultados obtenidos a partir de los ensayos de pérdida de peso como los de ICP y microscopía electrónica de barrido ambiental están de acuerdo con el proceso de degradación uniforme y congruente descrito por Bunker *et al* [16].

Los ensayos de pH mostraron que el fluido reacciona con la superficie de los vidrios desde los primeros instantes de contacto. Las reacciones de hidratación e hidrólisis mencionadas en el párrafo anterior contribuyen notablemente a los cambios de pH. En un estudio anterior a éste con vidrios en el sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O se comprobó que

los vidrios con un mayor porcentaje de P_2O_5 tenían un menor pH y que los que tenían mayor porcentaje de Na_2O poseían los valores de pH más altos debido al carácter básico de este óxido, a pesar de ser más solubles [2]. Los cuatro vidrios estudiados en este capítulo poseen el mismo porcentaje de P_2O_5 y CaO por lo que en este caso las pequeñas variaciones de pH no son debidas a la cantidad de P_2O_5 en el sistema vítreo, sino a la cantidad de Na_2O y la presencia del ión TiO_2 . De este modo, G0, el vidrio con mayor porcentaje de óxido de sodio y sin TiO_2 resultó ser un poco más básico o más cercano al pH neutro (7,00).

Por otra parte, en un estudio previo [17] se mostró que los vidrios en el sistema P_2O_5 - CaO - Na_2O con una composición molar de 44,5% P_2O_5 y CaO y un 11% en Na_2O , es decir, el G0, forma precipitados de fosfato de calcio en la superficie del material después de la inmersión en SBF a 37°C. Sin embargo, con la adición de TiO_2 en la red vítrea no se observó ningún tipo de precipitado o capa de fosfato de calcio, lo cual es consistente con otros estudios realizados con vidrios con porcentajes similares de P_2O_5 y CaO y cuyos autores afirman que vidrios de fosfato poco solubles con altos contenidos de CaO no forman este tipo de capa [14;18].

Los espectros Raman mostrados en la Figura 3.9 reflejan esta situación ya que la formación de un precipitado de fosfato de calcio podría estar relacionada con la presencia de la banda correspondiente a los grupos Q^0 que aparecen en el espectro del G0 después de 9 semanas de inmersión en SBF. Estos grupos Q^0 corresponden a los grupos ortofosfatos, es decir, tetraedros de fosfato aislados (PO_4), y tienen la capacidad de formar enlaces con los iones Ca^{2+} que están dispersos en la solución y como consecuencia pueden originar precipitados de fosfato de calcio.

A diferencia del vidrio G0, los espectros Raman mostrados en las Figuras 3.8 y 3.9 revelaron que a lo largo de las diferentes etapas de disolución, la superficie de los vidrios con TiO_2 y específicamente el vidrio G5, presentó la misma estructura que el material original, es decir, que el material a 0 semanas de degradación.

Un aspecto que hay que tener en cuenta en la interpretación de los espectros Raman es que dentro de un mismo espectro las diferencias de intensidades están relacionadas con la proporción de los grupos presentes en el vidrio. Sin embargo, para comparar la cantidad de los diferentes grupos presentes a partir de espectros distintos, es indispensable que las medidas hayan sido realizadas el mismo día, ya que cualquier modificación en la alineación del láser o en la incidencia de la fuente de energía sobre la muestra puede conllevar cambios en la intensidad del espectro final, con lo cual ya no sería posible comparar las intensidades entre los diferentes espectros.

El análisis de las diferentes muestras de vidrio a lo largo de la degradación no fue llevado a cabo el mismo día. Por lo tanto, las condiciones de análisis fueron diferentes y no es posible comparar las intensidades obtenidas en los distintos espectros. No obstante, el hecho de que los espectros mostrados en la Figura 3.8 hayan presentado una disminución considerable en la intensidad a través del período degradativo, podría deberse principalmente a las irregularidades de la superficie del vidrio debidas a la degradación que dificultan la obtención de la señal. Se han mostrado sólo los espectros de la degradación del G5 ya que los otros vidrios han arrojado resultados similares. Por lo que el G5 que es la composición intermedia es representativa del grupo de vidrios estudiados.

El hecho de que en el caso del vidrio sin TiO_2 se hayan observado precipitados de fosfato de calcio y en el caso de los vidrios con TiO_2 incorporado no se haya observado la presencia de éstos, puede estar relacionado con la notable disminución en la solubilidad del vidrio producida por la formación de una red vítrea más reticulada con enlaces P-O-M más fuertes debido a la incorporación del ión Ti, lo cual retrasa tanto la hidratación como la hidrólisis (ruptura de enlaces) de las cadenas que conforman la red durante el período de tiempo estudiado. Sin embargo, a pesar de que esos grupos ortofosfatos de calcio, no se observan durante el período de tiempo estudiado, no puede excluirse la idea de que aparezcan después de tiempos de disolución mayores.

Por otro lado, las propiedades mecánicas del material, específicamente el módulo elástico, experimentó un leve descenso durante las primeras semanas de degradación y luego permaneció casi constante a lo largo del período de degradación para cada uno de los vidrios estudiados. Este comportamiento puede atribuirse al proceso de degradación superficial y uniforme que experimenta este tipo de vidrios.

En las imágenes de microscopía electrónica, se ha visto que durante las primeras semanas, debido al mecanismo de degradación superficial del material se forman numerosos agujeros y la capa de hidratación. Es posible, que la señal obtenida por los ultrasonidos haya sido interrumpida debido a las diferencias microestructurales del material, y esto haya ocasionado una disminución en los valores del módulo elástico. Luego, debido a que el interior del material se mantiene prácticamente intacto, el material preserva su módulo elástico. Esto representa un punto de gran importancia cuando nos referimos a materiales reabsorbibles los cuales tienen como finalidad soportar las cargas necesarias durante el período de regeneración del hueso y simultáneamente, deben experimentar una degradación progresiva dando paso a la formación del nuevo tejido.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que los vidrios de fosfato en el sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$ ofrecen una alternativa interesante como materiales de

reabsorción controlada ya que dependiendo de la composición utilizada, es posible obtener diferentes velocidades de degradación. Asimismo, el mecanismo de degradación superficial les permite mantener las propiedades mecánicas durante el período de degradación. Por lo tanto, los vidrios solubles desarrollados y caracterizados en este estudio presentan desde el punto de vista físico-químico y mecánico, un gran potencial como materiales para regeneración ósea. En el siguiente capítulo se evaluará la citotoxicidad de estos materiales.

3.5. REFERENCIAS

1. Clement J, Eckeberg L, Martínez S, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA: Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of phosphate glasses in the system P_2O_5 -CaO- Na_2O . Key Engineering Materials 1998;11:141-144.
2. Clement, J. Desarrollo y Caracterización de un Material Compuesto Totalmente Biodegradable para Aplicaciones Quirúrgicas. Tesis Doctoral 1-294. 2001. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.
3. Kishioka A, Haba M, Amagasa M: Glass Formation in Multicomponent Phosphate Systems Containing TiO_2 . Bulletin of the Chemical Society of Japan 1974;47:2493-2496.
4. Pivac B, Mogus-Milankovic A, Day DE: Iron valence and coordination in phosphate glasses as studied by optical spectroscopy. Journal of Non-Crystalline Solids 1998;226:41-46.
5. Vogel P, Wange P, Hartmann P: Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. Glasstech.Ber.Glass.Sci.Tech 1997;70:220.
6. Clement J, Avila G, Navarro M, Martínez S, Ginebra MP, Planell JA: Chemical Durability and Mechanical Properties of Calcium Phosphate Glasses with the Addition of Fe_2O_3 , TiO_2 and ZnO . Key Engineering Materials 2001;192-195:621-624.
7. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T: Solutions Able to Reproduce In vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. Journal of Biomedical Materials Research 1990;24:721-734.
8. Protocolo para la preparación de SBF, documento interno Grupo de Biomateriales del Departamento de Ciencia de los Materiales y Ingeniería Metalúrgica. 1998. Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya.
9. Brow RK: Review: the structure of simple phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids 2000;263-264:1-28.
10. Kasuga T, Abe Y: Calcium phosphate invert glasses with soda and titania. Journal of Non-Crystalline Solids 1999;243:70-74.
11. Galeener FL, Mikkelsen JC: Raman-Spectra and Structure of Pure Vitreous P_2O_5 . Solid State Communications 1979;30:505-510.
12. Fang XY, Ray CS, Marasinghe GK, Day DE: Properties of mixed Na_2O and K_2O iron phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids 2000;263:293-298.
13. Day DE, Wu Z, Ray CS, Hrma P: Chemically durable iron phosphate glass wastefoms. Journal of Non-Crystalline Solids 1998;241:1-12.

14. Delahaye F, Montagne L, Palavit G, Touray JC, Baillif P: Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 1998;242:25-32.
15. Brow RK, Tallant DR, Warren WL, McIntyre A, Day DE: Spectroscopy studies of the structure of titanophosphate and calcium titanophosphate glasses. *Physics and Chemistry of Glasses* 1997;38:300-306.
16. Bunker BC, Arnold GW, Wilder JA: Phosphate-Glass Dissolution in Aqueous-Solutions. *Journal of Non-Crystalline Solids* 1984;64:291-316.
17. Clement J, Manero JM, Planell JA, Avila G, Martinez S: Analysis of the structural changes of a phosphate glass during its dissolution in simulated body fluid. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1999;10:729-732.
18. Franks K, Abrahams I, Knowles JC: Development of soluble glasses for biomedical use Part I: In vitro solubility measurement. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2000;11:609-614.