

## DETERMINACION DE LA BIOACTIVIDAD Y LA RESISTENCIA A LA COMPRESION DE BLOQUES DE POLIAPATITA®

Haney Castro Fernández\* y Oscar E. Ledea Lozano

Departamento de Investigación-Desarrollo, Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6214- 6414, Ciudad de La Habana, Cuba

Recebido em 24/7/09; aceito em 28/11/09; publicado na web em 26/3/10

DETERMINATION OF THE BIOACTIVITY AND THE COMPRESSION RESISTANCE OF POLIAPATITA®. Poliapatita® is a composite in study formed by HAP-200®, CaCO<sub>3</sub> and POVIAC®. The aims of this work were the determination of the bioactivity and the compression resistance (CR) of biomaterial. The composite was put in contact with a Simulated Body Fluid (28 days at 37 °C) to evaluate the formation of an superficial apatite layer similar to the bone mineral composition; and to see how diminished the CR in conditions similar to implantation. The bioactivity was evaluated mainly by Scanning Electron Microscopy, Energy-dispersive X-ray Spectroscopy. The composite studied was bioactive and fulfills the requirement of CR asked by ISO 13779-1:2001.

Keywords: Poliapatita®; compression resistance; bioactivity.

### INTRODUCCION

Debido a diferentes factores, entre los que se encuentran: al aumento de las expectativas de vida de la población, la disminución de la morbilidad y mortalidad, el aumento de los presupuestos de salud, la mejora de la calidad de vida, la práctica de deportes extremos, los accidentes de tráfico, y los conflictos bélicos; se ha hecho imprescindible la utilización de tejido óseo en la cirugía ortopédica. Sin embargo, los injertos óseos tienen una serie de inconvenientes como son las complicaciones vinculadas a la limitada cantidad de hueso a extraer, la morbilidad en el lugar de extracción (dolor, hematoma, hernias abdominales, etc.) cuando son autólogos, así como los potenciales riesgos de carácter infeccioso e inmunológico (hepatitis, [VIH], priones, etc) en el caso de los injertos heterólogos.<sup>1,2</sup>

Estos inconvenientes han impulsado al hombre a la búsqueda de diferentes alternativas para solucionar estas deficiencias, siendo los aloinjertos una de las vías empleadas. Los biomateriales por definición son cualquier sustancia (que no sea una droga) o combinación de sustancias, de origen sintético o natural, que se use por cualquier lapso de tiempo, como un todo o parte de un sistema que trata, aumenta, o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del organismo.<sup>3</sup>

Una de las características más importantes que debe poseer un biomaterial para ser empleado como sustituto del injerto óseo es la bioactividad. Esta propiedad es la capacidad que tiene un material de interactuar con los tejidos (blandos y duros) del organismo.<sup>4,5</sup> Los ensayos de bioactividad *in vitro*, son una herramienta para probar la posible bioactividad de un material; para ello las muestras se colocan en contacto con una disolución de fluido biológico simulado (SBF, siglas en inglés), el cual tiene una composición iónica similar a la del Plasma Sanguíneo Humano.<sup>6</sup>

Por otra parte, los estudios para la evaluación de las propiedades físico mecánicas de un biomaterial permiten determinar la capacidad de estos de soportar las cargas mecánicas a las que van a estar sometido durante el cumplimiento de su función específica. Cualquier estado de carga complejo puede expresarse en función de los siguientes modos de sollicitación básicos: fuerzas axiales (tracción y compresión), fuerza de corte, de flexión y momento de torsión.<sup>7</sup>

Uno de los más empleados en el estudio de los materiales frágiles es la resistencia a la compresión.<sup>8,9</sup>

Los objetivos de este trabajo son la evaluación *in vitro* de la bioactividad de un biomaterial compuesto, nombrado en lo adelante Poliapatita® y la determinación de su resistencia a la compresión en forma de bloque. La Poliapatita® es un material compuesto por hidroxiapatita Coralina HAP-200®, carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), y acetato de polivinilo (POVIAC®) que se ha desarrollado con el objetivo de ser empleado como sustituto óseo, ya que tiene una composición química que aunque no idéntica, presenta una gran similitud con la del tejido óseo en cuanto al contenido de calcio, microelementos y estructura; propiedades que determinan que este biomaterial actúe no solamente como osteoconductor, sino que paulatinamente se convierta y de origen a la formación de un nuevo hueso en su lugar.<sup>10-13</sup> En diferentes estudios se ha demostrado la elevada bioactividad *in vivo* de las hidroxiapatitas (HAs), como refieren Patel y colaboradores, y los realizados en el Hospital Militar "Dr. Carlos J. Finlay", Cuba, desde el año 1988 para tratar defectos óseos subsiguientes a la cirugía de exéresis de tumoraciones benignas de las extremidades,<sup>14,15</sup> sin embargo no se cuenta con evidencia documental sobre la existencia de esta propiedad en el POVIAC®, de ahí que se imponga la necesidad de realizar un estudio *in vitro* de bioactividad en SBF.

Por otro lado, nunca se han realizado evaluaciones mecánicas de la Poliapatita® en forma de bloque, por tanto no se ha demostrado su capacidad de soportar determinadas cargas, lo cual podría ampliar el campo de aplicaciones de este compuesto.<sup>4</sup>

### PARTE EXPERIMENTAL

Los ensayos se realizaron empleando bloques cilíndricos de Poliapatita® de dimensiones 1 x 2 cm elaborados según la ISO 13779-1<sup>11</sup> y suministrados por el Departamento de Producción de la Dirección de Química del Centro Nacional de Investigaciones Científicas según el procedimiento previamente descrito.<sup>10</sup>

#### Determinacion de la bioactividad *in vitro*

La evaluación de la interacción del biomaterial con el medio fisiológico se realizó sumergiendo las muestras en una disolución de SBF,

\*e-mail: haney.castro@cnic.edu.cu

la cual se preparó, según la técnica descrita por Kokubo y colaboradores.<sup>6,16</sup> La relación volumen de SBF/área de biomaterial empleada fue 10 mL/cm<sup>2</sup>. Las muestras embebidas en la disolución se conservaron en una incubadora a 37 °C durante todo el ensayo. Las muestras de Poliapatita® fueron analizadas a los 1, 7, 14 y 28 días con el objetivo de verificar el paulatino aumento de la capa apatítica con el tiempo de exposición del biomaterial en SBF. La microscopía electrónica de barrido (MEB) y la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) se emplearon como criterio fundamental de la evaluación de la bioactividad del biomaterial ensayado. Además, se monitoreó diariamente el pH de la disolución de SBF utilizando un medidor de pH PR“A”CITRONIC (Alemania) para monitorear la formación de la hidroxiapatita en la superficie del biomaterial. Se determinaron las concentraciones de los iones calcio y fósforo al SBF una vez extraídas las muestras, ya que una disminución en la concentración de estos iones es indicativo de la precipitación de los mismos y de la formación de una capa rica en Ca y P sobre la superficie de los materiales bioactivos.

### Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) y energía dispersiva de rayos X (EDX)

El análisis por MEB se realizó empleando un equipo JSM-5310 Jeol scanning electron microscopy con energía del haz de electrones de 20 KV y una distancia de trabajo de 10 mm, para detectar la formación de la capa apatítica. Además se determinó la composición química de las muestras midiendo las señales correspondientes a los rayos X emitidos mediante EDX.

### Determinación de la concentración de iones calcio

La variación de la concentración de iones calcio del SBF donde se encontraban sumergidas las muestras fue monitoreado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica de llama GBC Avanta P. Para ello se tomaron 2 mL de cada disolución y se llevaron a sales húmedas. El sustrato obtenido se redisolvió en 20 mL de HCl 0,1 M y se añadió 0,1 mL de cloruro de lantano para eliminar la interferencia del fósforo.

### Determinación de la concentración de iones fósforo

El fósforo se determinó mediante una técnica de valoración colorimétrica a través de la formación del complejo fosfomolibdico. Para ello se tomaron 6 mL de muestra y se llevaron a sales húmedas. El sustrato obtenido se redisolvió en 20 mL de HCl 0,1 M y se trasladó a un frasco volumétrico de 50 mL.

### Resistencia a la compresión

Se determinó la resistencia a la compresión (RC) antes y después de la inmersión del biomaterial durante 14 días en SBF para simular las condiciones de implantación.

La determinación de la RC se realizó en una máquina universal de ensayos P-20 (Rusia), con célula de carga de 4 toneladas y a una velocidad de aplicación de la carga de 1 mm/min. Las probetas empleadas en el estudio, se elaboraron según la norma ISO 13779-1.<sup>11</sup> Se realizaron tres réplicas de cada grupo (antes y después de 14 días de contacto con SBF). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico *Statgraphics Plus 5.1*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La evaluación de la formación de una capa apatítica en un material implantable en contacto con una disolución de SBF es útil para deter-

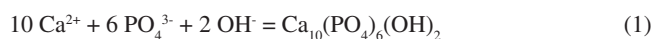
minar *in vitro* la capacidad preliminar de formar enlace con el hueso una vez implantado. Cuando un material bioactivo es implantado en un cuerpo vivo se forma en su superficie una capa rica en calcio y fósforo. El material se conecta entonces con el tejido vivo a través de la capa apatítica, lo cual puede ser reproducido en la superficie del material en contacto con SBF, ya que la apatita así formada es muy similar a la porción inorgánica del hueso en cuanto a composición y estructura.<sup>16</sup> En este estudio demostramos la bioactividad de la Poliapatita®. En la Figura 1A se puede observar una micrografía correspondiente a la muestra control de Poliapatita® mediante su inmersión en SBF, en esta se reconoce como el polímero agrupa todas las partículas inorgánicas (HAs y CaCO<sub>3</sub>), lo cual fue corroborado con EDX, donde sobresalen los picos de oxígeno típicos del polímero, los del calcio correspondientes a las cerámicas y los de fósforo correspondientes a las HAs.

Transcurridas 24 h de inmersión del biomaterial en SBF, Figura 1B se evidenció la presencia de cristales en forma de aguja en la superficie del biomaterial. Para este tiempo el SBF donde se encontraban sumergidas las muestras presentó un pronunciado descenso en la concentración de los iones calcio y fósforo Tabla 1, y un mantenimiento del pH con valores entre 7,42 y 7,45, que se extendió durante los primeros 5 días. Estos resultados podrían ser la consecuencia de que al sumergir las muestras en SBF, la HA que no queda cubierta por el polímero, posee una carga negativa debido a la presencia de iones OH<sup>-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> que se encuentran en la superficie.

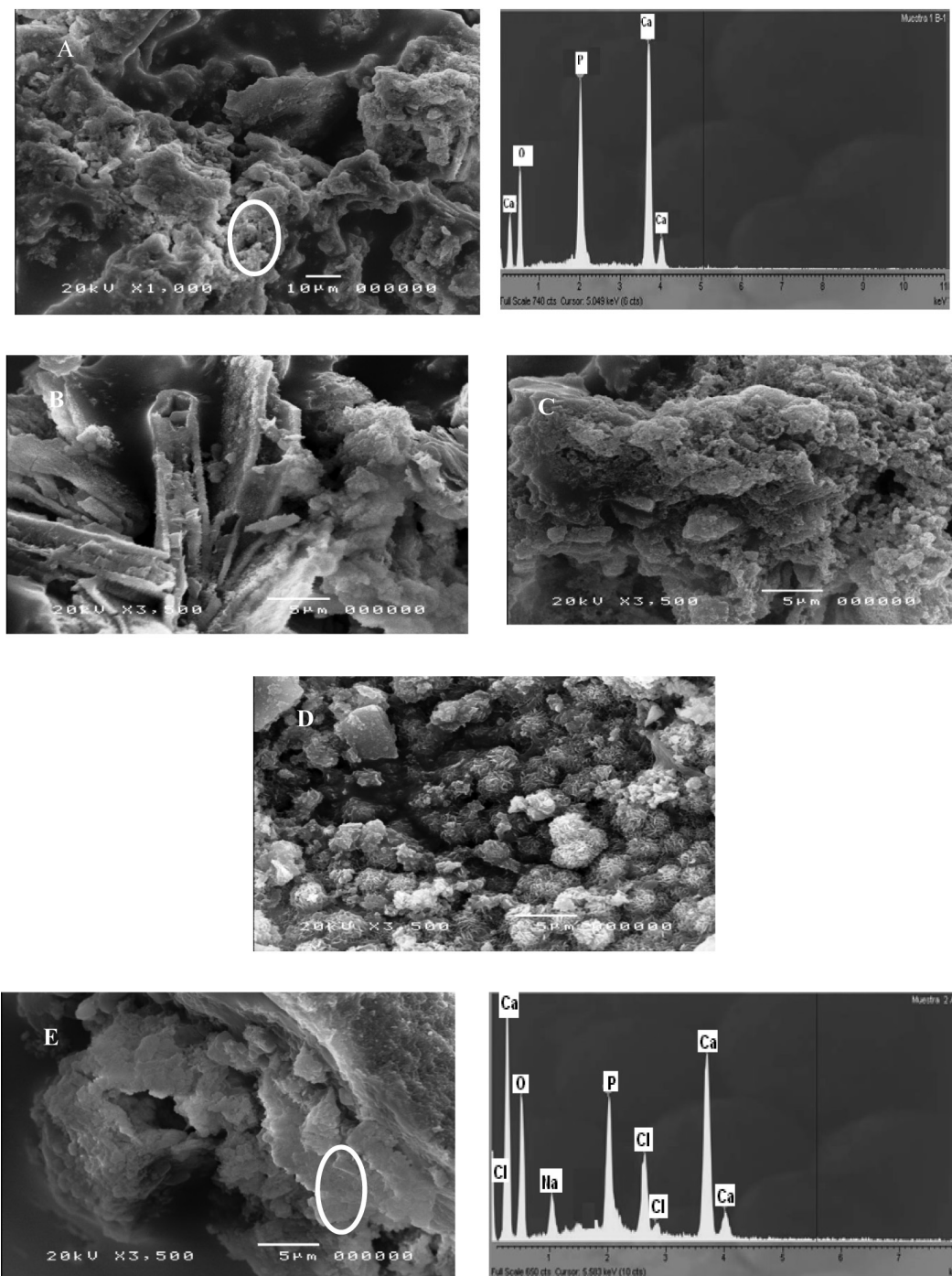
**Tabla 1.** Variación de la concentración de los iones calcio e iones fósforo en el SBF con el tiempo

Tiempo (días)	Conc. Calcio (ppm)	Conc. Fósforo (ppm)
0	2.330 ± 0.001	1.475 ± 0.002
1	1.806 ± 0.002	1.106 ± 0.001
7	1.760 ± 0.001	0.368 ± 0.001
14	1.596 ± 0.001	0.536 ± 0.002
28	3.643 ± 0.001	0.475 ± 0.001

Ya para los 14 días los cristales en forma de aguja se encontraban agrupados formando colonias Figura 1D, y las concentraciones iónicas de calcio y fósforo del SBF, continuaron disminuyendo de forma más suave en el calcio, pero más pronunciada en el fósforo. Estos iones selectivamente se combinan con los iones de Ca<sup>2+</sup> que se encuentran en la disolución de SBF. Cuando los iones de calcio se acumulan en la superficie, esta adquiere una carga positiva, y entonces, puede combinarse con los iones de carga negativa de fosfato que se encuentran en el medio, formando en esta ocasión un fosfato de calcio amorfo. Esta tendencia puede estar dada por la formación de precipitados de fosfatos de calcio, entre ellos la hidroxiapatita (HA) (Ecuación 1), lo cual provoca un rápido consumo de iones OH<sup>-</sup> presentes en la disolución, pasando a formar parte del precipitado y el recubrimiento, y quedando libres los iones H<sup>+</sup> lo cual provoca una disminución del pH del medio hasta alcanzar valores cercanos a 6,4. Es decir, la competencia que se establece entre los mecanismos de disolución y precipitación, donde el calcio de la disolución se reprecipita como fase insoluble por el alto contenido de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y menor contenido de Ca<sup>2+</sup> y OH<sup>-</sup>. Esta es una fase metaestable y eventualmente se transforma en una apatita similar a la fase mineral del hueso, además el pH del medio propicia la precipitación de HA preferentemente Ecuación 1.<sup>17</sup>



A partir del día 14 ocurre una reducción de la velocidad de formación de la HA ya que la concentración de los iones fosfatos en la disolución disminuye a la mitad del contenido inicial.



**Figura 1.** Micrografía de bloque de poliatapita tras su extracción del SBF<sup>®</sup>. A Control con su EDX correspondiente. B A las 24 h. C- A los 7 días. D- A los 14 días. E-A los 28 días tras su extracción de SBF

En la Figura 1E se distingue un detalle de un poro del biomaterial tras su extracción a los 28 días, cuyo interior se encuentra recubierto totalmente de partículas apatíticas lo cual se demostró por EDX, la presencia del sodio y del cloro en el EDX son residuos del SBF. Para esta fecha se puede observar un aumento muy significativo en la concentración del calcio en el SBF lo cual puede ser el resultado de la liberación por parte del polímero de la HA y el  $\text{CaCO}_3$  ocluido en este.

De forma general, se observa una proporcionalidad directa entre el tiempo de contacto de la muestra con el SBF y el incremento del área cubierta por la formación apatítica en la superficie del *composite*.

Los *composites* en seco presentaron valores de  $\text{RC} = 4,5 \pm 0,5$  MPa. Debido a que el destino final de estos biomateriales es su implantación

en el cuerpo humano donde estarán en contacto con fluidos corporales, se repitió este ensayo sumergiendo durante 14 días las muestras en SBF. Los valores de RC obtenidos en este caso fueron de  $3,0 \pm 0,1$  MPa, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos para un *p* valor de 0,0214 y un 95% de nivel de confianza. Esta disminución del valor de RC después de la inmersión en SBF puede ser el resultado del inicio de la liberación de las partículas inorgánicas ocluidas en el polímero. Se ha comprobado que al estar este polímero en un medio acuoso, el agua difunde hacia el seno de la matriz, al alcanzarse cierta concentración de agua (3,5% a temperatura 37 °C) en la fase mixta polímero-agua formada, esta se hace inestable y se separa en dos fases, una rica en polímero y la otra prácticamente constituida por agua. Este proceso se

repite en la fase rica en polímero tomando agua del medio exterior y de las goticas de agua inicialmente formadas. Como resultado de múltiples repeticiones del proceso el número de goticas crece y la dimensión de las mismas decrece. Finalmente las goticas se tocan formando canales por los que pueden difundir las partículas inorgánicas ocluidas en la matriz polimérica hacia el medio acuoso exterior.<sup>18</sup>

Por otro lado, se ha planteado una dependencia muy fuerte entre la viscosidad y bajas concentraciones de agua en el POVIAC® (<1 a 2,5%) que provocan la relajación de las moléculas de la matriz polimérica y formación de un hidrogel.<sup>19</sup> No obstante el biomaterial antes y después de su inmersión en SBF, cumple con lo exigido por la ISO 13779-1 para los implantes cerámicos, RC > 1,5 MPa,<sup>11</sup> así como con los valores de resistencia a la compresión reportados para el hueso trabecular (3-20 MPa).<sup>20</sup>

## CONCLUSIONES

Se evidenció que el biomaterial compuesto estudiado es bioactivo ya que se formó una capa apatítica en su superficie. El área de dicha capa fue proporcional al tiempo de contacto del *composite* con el SBF.

El *composite* estudiado cumple con lo exigido por la ISO 13779-1 para los implantes cerámicos, RC > 1,5 MPa, así como con los valores de resistencia a la compresión reportados para el hueso trabecular (3-20 MPa).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. R. González por permitirnos trabajar con su formulación. Al Dr. M. F. de Souza y a la MSc. M. de Oliveira por su apoyo en la realización de los análisis por MEB. Al CAPES (Consejo de Ayuda a Pesquisadores de Brasil) por el financiamiento de una bolsa posdoctoral que permitió la realización de los ensayos de MEB. A la MSc. C. Becker y a la Tec. M. Echevarría por su ayuda experimental. A los MSc. N. Brizuela y J. Aragón por su apoyo.

## REFERENCIAS

1. Lax, A.; Ortega, V.; Meseguer, L.; Alcaraz, M.; Sepúlveda, P.; Clavel-Nolla, M.; *Rev. Esp. Patol.* **2005**, *38*, 16.
2. Sanzana, E.; *Tesis de Doctorado*, Universidad de Barcelona, España, 2004.
3. Dee, K.; Puleo, D.; Bizios, R.; *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*; John Wiley and Sons; New Jersey, 2002, p. 1.
4. Arias, D.; González, R.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2004**, *35*, 102.
5. Camero, S.; González, G.; Barrios, I.; Vásquez, M.; Spadavecchia, U.; *Rev. LatinAm. Met. Mat.* **2005**, *25*, 2.
6. Kokubo, T.; Takadama, H.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907.
7. Weiner, S.; Wagner, H. D.; *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 274.
8. Carrodeguas, R. C.; dos Santos, L. A.; de Oliveira, L. C.; da Silva, E. R.; Ortega, A. B.; Mondéjar, S. P.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **1999**, *30*, 157.
9. Sanzana, E. S.; Ginebra, M. P.; Torres, P. A.; Planell, J. A.; Navarro, M. E.; *Arch. Med.* **2007**, *39*, 132.
10. González, R.; Suzarte, P.; *Patente No. 23352/2009, OCPI, Cuba*, 2 de febrero de 2009. (Int. Cl. 8) A 61K 9/32, C 08F 2/01. Suzarte, P No. de solicitud: 1998/100 Int. Cl: A 61K 47/32, C 08F 118/08, 218/08, 6/00, 6/08, 8/12, 3/12.
11. ISO; *Implants for surgery. Hydroxyapatite. Ceramic hydroxyapatite*, 13779-1, 2000.
12. Aragón, J. F.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2008**, *39*, 94.
13. Aragón, J. F.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2006**, *37*, 179.
14. Patel, S. M.; *J. Aust. Ceram. Soc.* **2005**, *41*, 1.
15. Pereda, O. C.; Toca, R. C.; González, R. S.; *Rev. Cubana Ortop. Traumatol.* **2006**, *20*, 1.
16. ISO; *Implants for surgery. In Vitro evaluation for apatite-forming ability of Implants materials*, 23317, 2007.
17. Kokubo, T.; Kim, H.; Kawashita, M.; *Biomaterials* **2003**, *24*, 2170.
18. Pérez, M.; Suzarte, A.; Jordán, G.; Lariot, C.; Villegas, R.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2003**, *34*, 67.
19. Quesada, P. I.; Suzarte, A. P.; Rosado, A.; Echevarría, M.; *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2005**, *36*, 27.
20. Proubasta, I.; *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*, Ergon: Madrid, 1999.