



Síntesis y caracterización de perlas compuestas de nano-hidroxiapatita/quitosano por precipitación *in-situ*.

MALDONADO-SAAVEDRA, Octavio, DOMÍNGUEZ-SANTOS, Cristian Javier, RUBIÓ-ROSAS, Efraín y PADILLA-FLORES, Juan Manuel

Trabajo de Investigación

Resumen

La hidroxiapatita (HAp) se considera un material bioactivo que influye favorablemente en la adhesión, crecimiento y diferenciación osteogénica. Sin embargo, la pobre resistencia mecánica y la lenta cinética de reabsorción en comparación con el tejido circundante representan un gran inconveniente clínico. Por lo tanto, evitar la migración frecuente de las partículas de HAp del sitio del implante, disminuir la posibilidad de daños a los tejidos blandos próximos al implante, mejorar la biodegradabilidad, las propiedades de fraguado, la resistencia mecánica y la inyectabilidad de los biomateriales es una prioridad.

Para contribuir al desarrollo tecnológico de la ingeniería de tejidos, en este trabajo se sintetizó un compuesto de hidroxiapatita / quitosano (HAp/CHI) en forma de perlas, para su potencial aplicación en el proceso de regeneración ósea. El método de precipitación fue utilizado para obtener HAp nanométrica. Se utilizó el método de precipitación *in-situ* para incorporar la HAp a la matriz de CHI. El material fue caracterizado por microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja y por análisis químico elemental. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de cristales nanométricos (116 - 171 nm) de HAp incorporados en una matriz de CHI.

Hidroxiapatita, quitosano, precipitación *in situ*.

Abstract

Hydroxyapatite (HAp) is considered as a bioactive material which influence on the adhesion, growth, and osteogenic differentiation. However, the poor mechanical strength and the slow kinetic resorption as compared with the surrounding tissue represent a major clinical problem. Therefore, avoid the frequent migration of HAp particles from site the implant, reducing the possibility of damage to soft tissue next to the implant, improving biodegradability, setting properties, the mechanical resistance and the injectivity of biomaterials is a priority.

To contribute to the technological development of tissue engineering, this work will synthesize a composite of hydroxyapatite / Chitosan (HAp/CHI) in the form of pearls, for its potential application in the process of bone regeneration. The precipitation method was used to obtain HAp nanometer. *In situ* precipitation method was used to incorporate the HAp matrix of CHI. The material was characterized by scanning electron microscopy, x-ray diffraction, infrared spectroscopy and by elemental chemical analysis. The results obtained show the presence of crystals nanometric of HAp (116-171nm) embedded in a matrix of CHI

Hydroxyapatite, chitosan, *in-situ* precipitation.

Introducción

En la actualidad los avances tecnológicos en el ámbito de salud, han permitido que la expectativa de vida incrementa, las personas adultas representaran en las próximas décadas el grueso de la población, esta sobrevida implicara un aumento en las enfermedades asociadas a la fragilidad ósea. El desgaste del sistema óseo debido al envejecimiento es inevitable y por más que nuestras prácticas lleven al fortalecimiento de nuestras estructuras óseas, aun no se ha podido prolongar su función con el paso del tiempo Rachner et al. (2011).

Durante muchos años se han investigado materiales que sin importar la etiología de la disfunción ósea, ayuden al sistema a corregir las afecciones que comprometen su integridad, materiales que debido a sus propiedades pueden acoplarse al cuerpo y participar en conjunto con la actividad regenerativa del individuo.

La ciencia médica tiene el reto de respaldar las condiciones de salud para que los individuos continúen viviendo de la mejor manera posible. Los accidentes y algunas patologías óseas como la osteoporosis, cáncer de hueso, son algunas de las enfermedades habituales a las que se enfrenta la medicina. Debido a esto, surge la necesidad de crear materiales que ayuden a la reconstrucción de tejido óseo y que además se adapten a él. El biomaterial que se pretenda usar, debe de cumplir ciertas especificaciones que aseguren la salud del tejido: tiene que ser biocompatible, que imite el tejido que se está tratando, debe de proveer resistencia,

funcionalización y debe ser inocuo Bryers et al. (2012).

Actualmente los materiales (metales, polímeros, cerámicas o materiales compuestos) utilizados en la ingeniería de tejidos tienen diversas limitaciones, por ejemplo, el titanio (Ti) no sufre oxidación al estar inmerso en un ambiente agresivo como el cuerpo humano, pero no es reabsorbible Rios et al. (2013).

En el caso de los biopolímeros poseen baja osteoinductividad pero con mejores propiedades mecánicas y de degradación. Los materiales cerámicos poseen excelentes propiedades osteoinductivas, sin embargo, tienen baja degradación, baja resistencia mecánica y es difícil de moldear para adaptarse a los requisitos físicos y geométricos del sitio dado o defecto óseo. Por lo tanto, los compuestos de fosfato de calcio como la HAp a base de biopolímeros permiten la incorporación de propiedades ventajosas de los dos tipos de componentes Oglivie et al. (1987).

El CHI es utilizado con mayor frecuencia para preparar materiales compuestos de fosfato de calcio, debido a su biocompatibilidad, biodegradación e inocuidad Rios et al. (2013). Este biopolímero promueve la adhesión celular y es reabsorbido por medio de la hidrólisis enzimática, además, cuenta con propiedades curativas, hemostáticas y es flexible, lo cual la hace un excelente candidato para participar en la regeneración ósea Venkatesan y Kim (2010).

Los diferentes métodos de síntesis para la obtención de HAp proporcionan al material, distintas propiedades y características dependientes del tamaño. Por ejemplo, las partículas a escala nanométrica tienen la capacidad de mimetizarse en el tejido implantado, poseen un área superficial extensa, alta relación en tamaño y aspecto, propiedades físico-químicas y biológicas que son evidentes únicamente a esta escala Lechuga y Martínez (2006); Liu y Webster (2007). Sin duda, explorar las propiedades de la HAp a escala nanométrica representa un sinnúmero de oportunidades para la ingeniería de tejidos y otras áreas, lo cual justifica nuestro proyecto.

En este trabajo se recurrió a la precipitación *in situ* de HAp sobre CHI con el objetivo de controlar la arquitectura interna y la composición química de los materiales resultantes. Este procedimiento se basa en la obtención de materiales compuestos nanoestructurados y cristalinos de un componente biológicamente activo (en nuestro caso HAp), homogéneamente dispersos en la matriz polimérica (por ejemplo CHI) para imitar la apatita biológica del tejido óseo. La síntesis de este compuesto de acuerdo a estudios similares, teóricamente debería ser biocompatible, regenerativo y absorbible por el tejido óseo Manjubala et al. (2005); Kong et al. (2007).

El objetivo de este proyecto fue sintetizar un material constituido por HAp nanométrica y CHI para su potencial aplicación en el proceso de regeneración ósea. Los resultados obtenidos se limitan a las pruebas biológicas y de

biocompatibilidad, las cuales están contempladas como expectativas de la segunda etapa de este proyecto.

Materiales y métodos.

Para la preparación del compuesto de HAp y CHI se utilizó CHI de camarón marca Sigma 75% de desacetilación, ácido acético glacial marca Aylt con pureza de 99.94%, fosfato de amonio monobásico en cristales marca J. T. Baker con pureza del 99.5%, nitrato de calcio marca Fermont con pureza de 101.9%, hidróxido de sodio en escamas marca J. T. Baker con pureza de 97%, Metanol marca J. T. Baker con pureza de 99.9%, agua destilada marca J. T. Baker con grado de pureza del 99%.

Síntesis de HAp nanométrica.

Se montó el sistema de precipitación y se colocó una cuba con aceite para baño María, colocando un matraz de 3 bocas acoplado a un refrigerante conectado a una bomba de reflujo para llenar con agua el refrigerante. El aceite se calentó a 90°C, posteriormente se adicionó 250 ml de la solución de nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) 0.042M en agitación constante y posteriormente se agregó 250ml de la solución de fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.025M en agitación constante con un intervalo de 5 ml por minuto. Al término de agregar los 250ml de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se adiciona hidróxido de amonio (NH_4OH) en una cantidad suficiente para establecer un pH de 10.5 el cual se dejó en agitación constante a 90°C durante 3 hrs. Posteriormente se dejó enfriar y se filtró la HAp

precipitada. Finalmente se secó la HAp en una estufa a 40°C durante 12 hrs. Una vez transcurrido el tiempo de secado se procede a recolectar la HAp.

Síntesis de la película de CHI.

La película de CHI se sintetizó diluyendo 1g de CHI en una solución de ácido acético ($C_2H_4O_2$) al 1%, la cual se dejó en agitación hasta su homogeneidad. Posteriormente se depositó en una caja de Petri y se puso a reposar en la campana de extracción para formar la película.

Síntesis del compuesto de CHI/HAp nanométrica.

Para la síntesis se preparó una solución pH de 6.4 de $Ca(NO_3)_2$ 0.5 M, utilizando 2.95 g en 25 ml de agua destilada. Posteriormente se preparó una solución pH de 4.2 de $(NH_4)_2HPO_4$ 0.3 M, utilizando 0.86 g en 25 ml de agua destilada. Se preparó un gel de quitosano al 2% utilizando 50 ml de solución de $C_2H_4O_2$ de CHI. Se utilizó una solución al 1% de $C_2H_4O_2$ para diluir el CHI, para la cual se utilizaron 0.5 ml de $C_2H_4O_2$ grado glacial en 50 ml de agua destilada. Al gel de CHI pH de 4.2, se dejó en agitación hasta su homogeneidad. Posteriormente se añadió la solución de $Ca(NO_3)_2$ (en agitación constante) y se dejó en agitación por 30 minutos. A continuación se añadió la solución de $(NH_4)_2HPO_4$ gota a gota en la solución en agitación constante, posteriormente se dejó en agitación vigorosa por 2 hrs. hasta su homogeneidad. Posteriormente se dejó gotear el gel de CHI/HAp en la solución pH

13 de NaOH 1.5 % para formar perlas y se deja reposar toda la noche. Finalmente se separan las perlas de la solución por decantación y se lavaron 4 veces con agua fría y caliente alternadamente para remover todos los restos de NaOH y se dejó secar.

Caracterización.

La estructura cristalográfica fue analizada por difracción de rayos X (DRX) modelo Bruker D8 Discover con radiación CuK α . La morfología y el tamaño de partícula se determinaron por medio de espectroscopía electrónica de barrido (SEM). Adicionalmente, se realizó un análisis por espectroscopia infrarroja (IR) y un químico elemental (EDS) para identificar y cuantificar la composición elemental del composito.

Resultados y discusiones

Caracterización y análisis comparativo de las muestras.

En la figura 1 se observa picos característicos (líneas rojas) de la HAp, que se encuentra en $2\theta = 31.7, 32.2$ y 33 También es posible observar algunos picos secundarios de menor intensidad ubicada en $2\theta = 26, 40, 46.5,$ y 49 y otros menos intenso localizado en $2\theta = 29$ y 53.2 , que corroboran la existencia de HAp. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Rivera et al. en 2010. Obsérvese que los picos del difractograma de la muestra corresponden con el patrón de difracción de referencia, además son picos anchos y bien definidos los cuales son representativos de cristales a escala nanométrica.

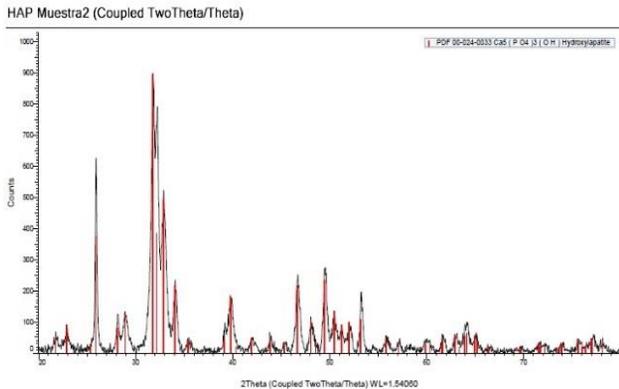


Figura 1. DRX de HAp comercial vs HAp sintetizada por precipitación.

En la figura 2 se puede observar además de los picos característicos de HAp (bandas rojas), dos picos característicos de CHI (bandas azules) $2\theta = 9.5$ y 18.5 . Estos resultados concuerdan con lo descrito por Yen et al. en 2009. Obsérvese que los picos del difractograma de la muestra de CHI y HAp son correspondientes a sus respectivos patrones de difracción de referencia.

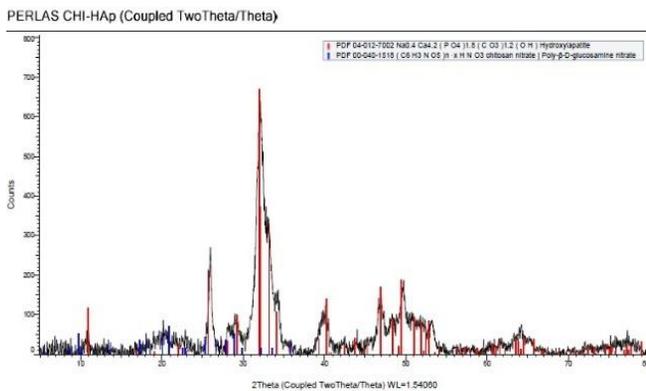


Figura 2. DRX del compuesto Nano-HAp/CHI.

Caracterización morfológica

Las muestras de CHI y del compuesto HAp/CHI se analizaron en un SEM (marca Jeol JSM-6610-LV), en las micrografías se observan partículas

abundantes y aglomeradas las cuales eran difusas por su tamaño nanométrico que oscilaba entre 116 - 171 nm (Figura 3a 15000 y 3b 30000 X). En las micrografías de las figura 4a y 4b, 500 y 1000 X respectivamente, se observan aglomeraciones de HAp nanométrica expuestas de manera superficial sobre la matriz de CHI.

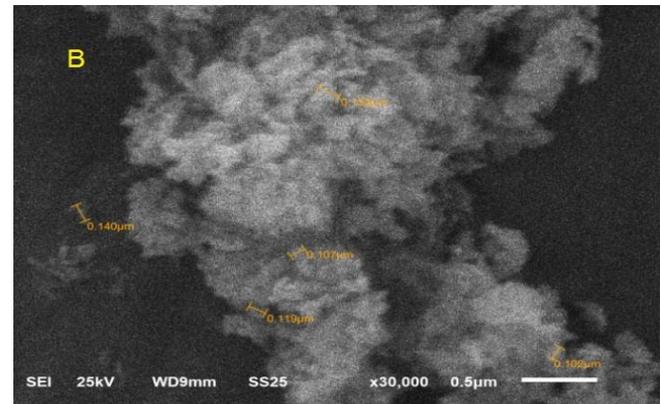
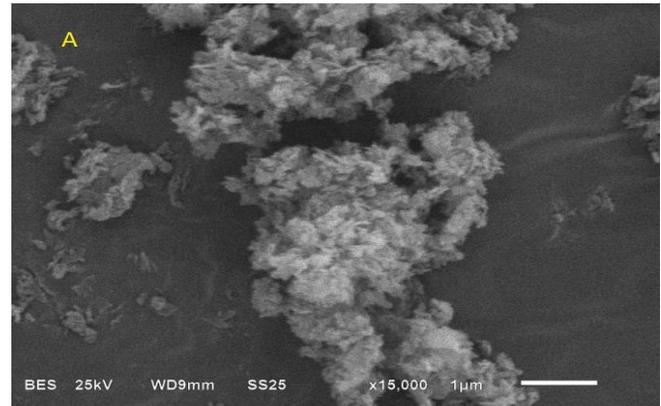
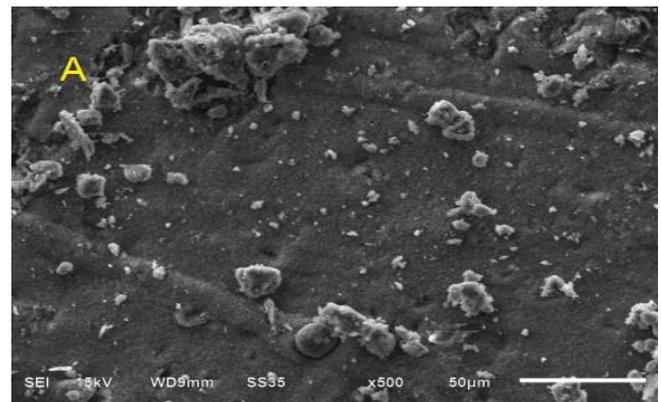


Figura 3 A y B. Micrografías a 15000 y 30000 X de HAp por SEM.



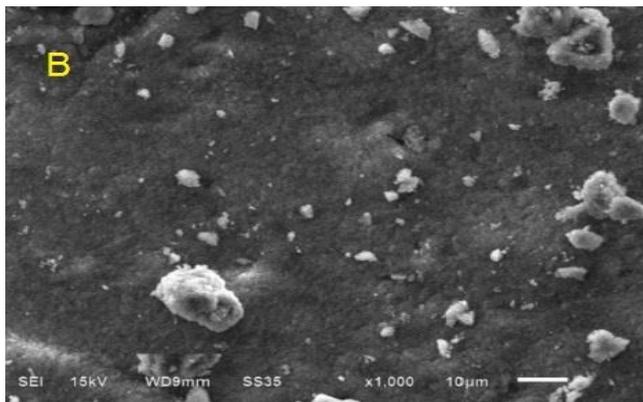


Figura 4 A y B. Micrografías a 500 y 1000 X del compuesto HAp/CHI por SEM

Se analizaron las muestras de HAp y del compuesto HAp/CHI mediante un microanálisis químico a nivel de partícula por EDS, para conocer la concentración porcentual de los elementos que conforman la muestra, siendo el peso porcentual del oxígeno del 50%, fósforo 16% y calcio 32% para HAp (Figura 5). En la figura 6 se observa la composición porcentual de los elementos que componen el compuesto HAp/CHI, siendo el peso porcentual del 60% para el oxígeno, 13% para el fósforo y 26% para el calcio.

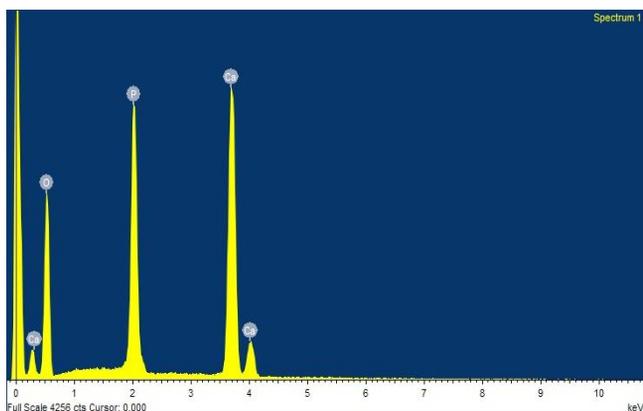


Figura 5. Análisis semicuantitativo de HAp por EDS.

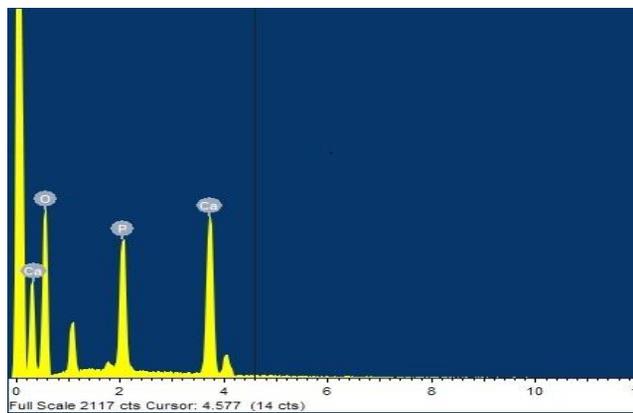


Figura 6. Análisis semicuantitativo del compuesto HAp/CHI por EDS

Se obtuvieron imágenes de microscopía de transmisión, donde se aprecian claramente las nanobarras formando aglomerados. El tamaño de las nanobarras de HAp fueron de aproximadamente de 120 nm de largo y 60 nm de ancho (Figura 7).

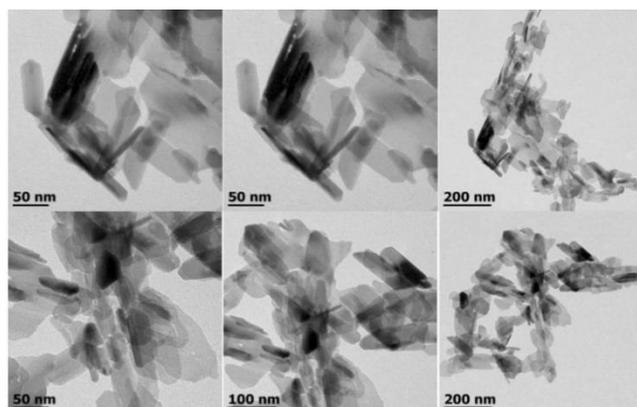


Figura 7. Micrografías por MET de HAp

En la figura 8 se presentan los espectros de infrarrojo de las muestras de HAp, CHI y el compuesto HAp/CHI (banda negra, azul y roja respectivamente). Las bandas observadas coinciden con las bandas de HAp reportadas por Liu et al. En 2003. Las bandas características del grupo fosfato a 1036, 604 y 565 cm^{-1} correspondientes a HAp.

Se observan bandas correspondientes a CHI en 1654 cm^{-1} que se le atribuye a la presencia de grupos -NH de aminas primarias, asociados a restos de grupos de acetamida después de su desacetilación, una banda a 1582 cm^{-1} es característica del grupo -NH_2 , a 1420 cm^{-1} corresponde al grupo CH_2 , en 1381 cm^{-1} corresponden a -CH y deformación de C-CH_3 , a 1154 cm^{-1} es característica de la tensión antisimétrica del grupo C-O-C , a 1036 cm^{-1} y 1082 cm^{-1} que de acuerdo a Maza y col en 2007, corresponden a las vibraciones del esqueleto propias de la estructura del CHI [14]. La banda más representativa correspondiente al compuesto HAp/CHI se encuentra aproximadamente a 1010 cm^{-1} .

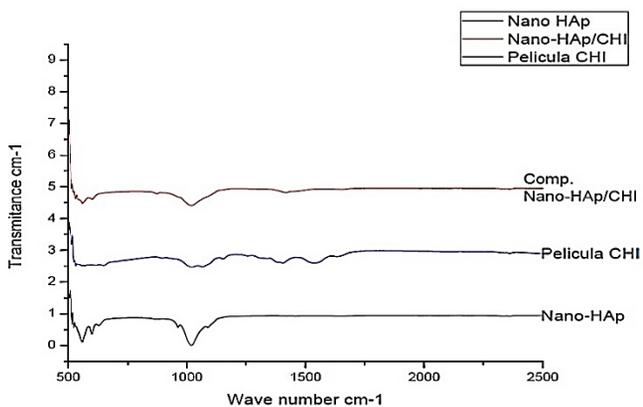


Figura 8. Espectros de IF de las muestras de HAp, CHI y del compuesto HAp/CHI.

Finalmente se logró obtener las perlas de HAp nanométrica soportadas en CHI, en la figura 9 se puede observar la formación de este compuesto en el vaso de precipitado. Como se mencionó anteriormente, nuestra expectativa es realizar las pruebas biológicas para determinar su

funcionalidad como material de regeneración y remplazo en cavidades óseas.



Figura 9. Formación de perlas de HAp nanométrica/CHI

Conclusiones

De acuerdo a la literatura, la síntesis del material obtenido reúne todas las características tanto químicas como biológicas para su potencial uso para la mineralización del tejido óseo dañado. El compuesto sintetizado mediante precipitación *in situ*, posee varias ventajas comparando a la síntesis convencional ya que se logró disminuir los costos y el tiempo de síntesis en 48 hrs, siendo lo habitual 96 hrs. Además se obtuvo relativamente de una manera más sencilla y estable durante la síntesis. La precipitación *in-situ* permitió que se pudiera sintetizar ambos materiales en un mismo día y empezar a formar el compuesto al día siguiente. Aunado a esto, tiene la ventaja de no necesitar altas temperaturas para precipitar la HAp. Se comprobó que la morfología del compuesto es dependiente de la cantidad de HAp incorporada en la matriz de CHI, a mayor concentración de CHI y menor HAp, la morfología de la muestra será esférica, si lo inverso ocurre, el crecimiento y orientación de los cristales de HAp será en forma

de escamas u hojuelas como lo reportado habitualmente.

Referencias bibliográficas

- Bryers, J., Giachelli, C., Ratner, B. (2012). *Engineering Biomaterials to Integrate and Heal: The Biocompatibility Paradigm Shifts*. *Biotechnol Bioeng* 109(8): 1898–1911

- Im, O., Li, J., Wang, M., Zhang, L., Keidar, M. (2012). Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* (7): 2087–2099.

- Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, et al. (2007). Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 22(3):223-39.

- Lechuga, L., Martínez, A. (2006). *Nanobiotecnología: Avances Diagnósticos y Terapéuticos*. *Revista de Investigación en Gestión de la Innovación y Tecnología* 35: 12-24.

- Liu H, Webster TJ. (2007). Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 28(2):354–369.

- Liu, J., Ye, x., Wang, H., Zhu, M., Wang, B., Yan, H., (2003). "The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method". *Ceramics International* 29; 629-633.

- M. Yen, J. Yang, J. Mau (2009). "Physicochemical characterization of chitin and

chitosan from crab shells". *Carbohydr Polym* 75: 5-21.

- Manjubala I, Woesz A, Pilz C, Rumpler M, Fratzl-Zelman N, Roschger P, et al. (2005). Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. *J Mater Sci Mater Med* 16(12):1111-9.

- Maza, I y Hernández, CH. (2007). Caracterización fisicoquímica del quitosano para su aplicación como bioabsorbente de metales. *REVCUNI* 11(1) 1-5.

- Oglivie, A., Frank, R., Benque, E., Gineste, M., Heughebaert, M., Hemmerle, J. (1987). "The biocompatibility of hydroxyapatite implanted in the human periodontum". *Journal of Periodontal Research* (22): 270-283.

- Rachner, T., Khosla, S., Hofbauer, L. (2011). *New Horizons in Osteoporosis*. *Lancet*. 9; 377(9773): 1276–1287

- Rios, T., López, M., Franco, A. (2013). Biomateriales compuestos de matriz polimérica con refuerzo de cerámico bioactivo usados en sistemas de fijación ósea, revisión del estado del arte. *Revista Colombiana de Materiales* (5): 270-276.

- Rivera, J., Fetter, G., Bosch, P. (2010). Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria* 5(4): 506-515.

- Venkatesan, J., Kim, SK. (2010). *Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview*. *Mar Drugs* 8(8): 2252–2266.