

Comparación Química y Mecánica entre el Hueso Humano y un Material Poroso de HA para Sustituto Óseo.

C. A. Guzmán Ariza¹, J. L. Díaz León¹, C. Hernández Navarro^{1*}, J. F. Louvier Hernández², R. Lesso Arroyo¹, E. García Bustos⁴, J. D. Castro León³,

¹Departamento de Ingeniería Mecánica, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya, Gto., México

²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya, Gto., México

³Departamento de Ingeniería Química, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya, Gto., México

⁴Cátedras-CONACYT, Universidad de Guadalajara, CUCEL, Guadalajara, Jalisco, México

*carolina.hernandez@itcelaya.edu.mx

Resumen—Con el objetivo de garantizar la similitud entre un material a base de fosfatos de calcio (CaPs), y hueso humano, en este trabajo se presenta una caracterización y posterior comparación entre los huesos humano y bovino; con un material desarrollado a partir de hidroxiapatita (HA), a la cual se le agregó un aglutinante, con la intención de obtener un material de andamio poroso para su aplicación como sustituto óseo. Las estructuras de los materiales y la composición química de los mismos fueron evaluadas por DRX, FTIR, mientras que su porosidad se analizó por micrografía óptica, en lo que respecta a sus propiedades mecánicas como dureza y el módulo de elasticidad, fueron evaluadas por un micro-durómetro Vickers, y una prueba de comprensión respectivamente.

Palabras clave— Andamios, Dureza, Hidroxiapatita, hueso humano, Porosidad.

I. INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular se ha convertido en una solución prometedora para satisfacer la demanda de tejidos y órganos para la medicina regenerativa. Algunos principios científicos y de ingeniería, permiten la producción de tejidos de reemplazo para la reparación quirúrgica [1].

La producción de andamios e implantes remodelados que sean capaces de soportar cargas de acuerdo con su entorno [2], son parte fundamental de la ingeniería tisular, mientras que lo siguiente, es decir insertarlo mediante una operación quirúrgica en un paciente, en el sitio donde se necesita reparar una fractura ósea [3], no pertenece en sí a esta rama de la ingeniería, pero sí es algo que se debe de tener totalmente en cuenta.

El uso de HA sintética como sustitutos óseos es ventajoso, ya que muchos de estos, no presentan respuesta inmunológica o irritante [2]. Aunque se han llevado a cabo extensas investigaciones sobre biomateriales sintéticos que sean adecuados para la impresión 3D de andamios para injertos óseos, existen pocos bien establecidos que pueden imprimirse e implantarse en el cuerpo. Estos materiales incluyen biocerámicos como bioglass, β -fosfato tricálcico (β -TCP) e hidroxiapatita (HA), y biopolímeros como (ácido poliláctico), ácido glicólico (PGA) y ácido láctico conjugado (PLGA) [4].

De los anteriormente mencionados, la HA, es uno de los biocerámicos utilizados más frecuentemente para la reconstrucción de los huesos y tejidos dentales, debido a su biocompatibilidad, baja densidad, estabilidad química y su similitud de composición con la fase mineral del hueso [5]. Además, de que no es inflamatorio y no causa ninguna respuesta inmunológica o irritante [6]. Aunque diversas investigaciones demuestran que los implantes que contienen fosfato bifásico (es decir, que contiene HA y β -TCP), muestran una mayor reactividad biológica y una mejor unión con los huesos naturales [7].

Los andamios porosos se utilizan para llenar grandes volúmenes de pérdida de hueso por fractura, lesión traumática u otro trastorno físico que afecta a la arquitectura ósea y la función en el cuerpo [4].

El objetivo de este trabajo es comparar (tanto química como mecánica y físicamente), un material poroso (formado por fosfato de calcio bifásico y ácido fosfórico) con el hueso humano. Esta comparación se logrará fabricando probetas porosas de las muestras por medio de la unión del polvo a través de un proceso de endurecimiento mediante presión aplicada.

II. METODOLOGÍA

A. Síntesis de fosfatos de calcio.

Para la síntesis de fosfatos de calcio (CaP's), se comenzó partiendo de cáscara de huevo triturada hasta obtener un polvo homogéneo, denominado calcita (CaCO_3), el cual fue tratado térmicamente a $1,200^\circ\text{C}$, por un tiempo mínimo de 3 horas, para obtener óxido de calcio. Se preparó una solución de óxido de calcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] y agua a 1.67M, paralelamente, se preparó una solución de ácido fosfórico ($\text{H}_3(\text{O}_4)$) a 1M. La solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se colocó en una parrilla eléctrica, hasta que alcanzó una temperatura uniforme de 30°C , y en agitación constante se añadió la solución de H_3PO_4 gota a gota. Una vez terminado el mezclado, la solución se deja en agitación constante durante 24h más, para después ponerlo en reposo por 48h en un desecador. Posteriormente, la solución se somete a un proceso de purificación, a una velocidad de 90

rpm y 90°C durante una hora. El precipitado obtenido finalmente se filtra, y se seca a 100°C durante 4h, para finalmente obtener la hidroxiapatita por medio de la calcinación del precipitado a 800°C por 3h, aplicando una rampa térmica de 5°C/min.

B. Preparación de las probetas.

El material usado para la fabricación de las probetas se obtuvo combinando 6.65g del polvo con una solución de H₃(PO)₄, al 10% (v/v) [8], y mezclando hasta lograr una pasta totalmente homogénea.

Posteriormente, se introdujo en una prensa hidráulica, comprimiendo con una fuerza de 0.5 toneladas durante aproximadamente 1 minuto, para finalmente ser secada en una estufa a 60°, por aproximadamente 24 horas.

C. Caracterización del material.

Se registraron los patrones de difracción de rayos X, tanto de los fosfatos de calcio (con y sin tratamiento térmico), los huesos humano y bovino, como la mezcla realizada para las probetas, utilizando un difractómetro de la marca TNX, modelo EASYX600 (ATG INSTRUMENTACION) con radiación Cu-K α . Los datos fueron colectados desde 2 θ =15°-65°, con un tamaño de paso de 0.02°, y una velocidad de 1°/min.

Los espectros infrarrojos (IR) se registraron en un espectrómetro de transformada de Fourier de la marca Thermofichser, modelo Nicolet is5 con una celda DRIFT acoplada y con un intervalo espectral de 4,000 a 500 ondas (cm⁻¹), a una resolución espectral de ondas superior a 0.8 ondas.

Por otra parte, para la determinación de porosidad, se hizo uso de un microscopio Carl Zeiss modelo 3781.

El ensayo de microdureza Vickers se realizó en base a la norma ASTM E384 [9], con un microdurómetro DorLab modelo MC-65.

La dureza se expresa mediante un valor numérico, el cual se determinará por medio de la ecuación (1).

$$HV = \frac{(1,854.4)(P)(9.81)}{(d^2)} \quad (1)$$

III. RESULTADOS.

A. Síntesis de fosfatos de calcio.

El tratamiento térmico se practicó en condiciones totalmente controladas, dado que los parámetros más importantes que pueden afectar las propiedades de HA

resultantes son la temperatura y la duración del tratamiento térmico [10].

B. Preparación de las probetas.

Una de las probetas obtenidas después de la compresión se muestra en la figura 1A, mientras que la 1B muestra un chip de hueso esponjoso.

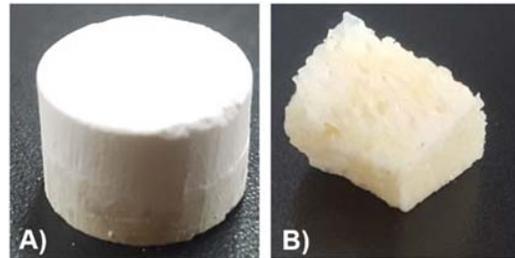


Fig. 1. A) Probeta fabricada con la mezcla. B) Chip de hueso esponjoso.

C. Caracterización del material.

Los espectros de difracción de rayos X, fueron comparados usando los patrones cristalográficos (de la Crystallography Open Database), ácido fosfórico (96-152-7385), de la calcita (No. 96-900-0096), del β -fosfato tricálcico (No. 96-721-7895) y el de la hidroxiapatita (No. 96 110-0067). Basándose en dichos patrones se realizó una comparación cuantitativa por medio del programa Match! 3.

Los espectros de difracción de rayos X, de los diferentes materiales, se pueden observar en la figura 2.

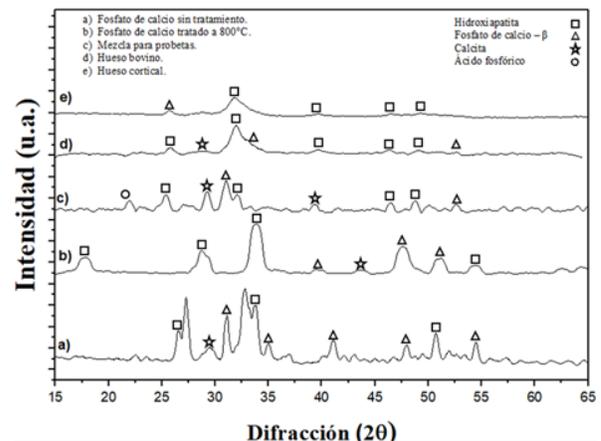


Fig. 2. Difractogramas de los materiales correspondientes.

En los espectros del fosfato sin tratamiento térmico (A) y el tratado a 800°C (B), se encuentra variaciones en los picos, debido a que uno de los parámetros más importantes que pueden afectar las propiedades de HA resultantes son la temperatura y la duración del tratamiento térmico [7]. En el

espectro C (mezcla para probetas), se alcanza a observar residuos de ácido fosfórico, el cual fue usado como aglutinante, los demás picos son parecidos a los del hueso cortical humano (E), solo que este último los presenta en menos intensidad. Finalmente, en los espectros D y E, demuestran que tanto el hueso bovino como el humano predominan las fases de HA β -TCP, con algunos picos característicos de calcita.

La figura 3, muestra el espectro FTIR de los materiales fosfato de calcio sin tratamiento térmico (A), fosfato de calcio tratado a 800°C (B), mezcla para probetas (C), hueso bovino (D) y hueso humano cortical (E), en el cual se pueden observar picos de absorción característicos de los iones carbonato (CO_3^{2-}), fosfato (PO_4^{3-}) e hidróxido (OH^-), los cuales se encuentran presentes tanto en el fosfato tricálcico, la calcita, así como en la hidroxiapatita.

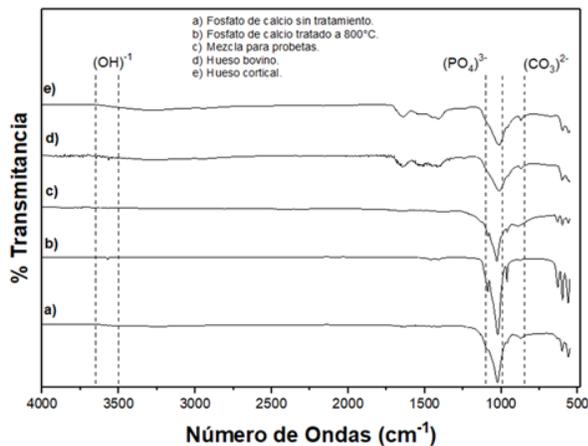


Fig. 3. Espectroscopía infrarroja de los materiales.

Los principales picos observados en todos los espectros se presentan entre 990cm^{-1} y $1,100\text{cm}^{-1}$, los cuales corresponden al ion fosfato. También se pueden observar un poco menos pronunciados, picos de absorción de 850cm^{-1} y 990cm^{-1} , los cuales representan al ion carbonato, el cual está principalmente presente en la calcita (también llamada carbonato de calcio), y algunos aún en menor escala se ubican en 3500cm^{-1} y 3650cm^{-1} , que son correspondientes al ion hidróxido.

En los espectros correspondientes al fosfato de calcio sin tratamiento térmico y al tratado a 800°C, se puede observar un pico pronunciado de carbonato de calcio. El de la mezcla para probetas se observa más un poco más refinado, con picos más discretos a comparación de los dos anteriores (esto se debe a la incorporación del aglutinante), con lo cual este espectro, logró asemejarse más al espectro del hueso, tanto bovino, y al humano (que presentan similitudes).

En las micrografías, se midió la porosidad, por medio del programa ZEN (blue edition). Tanto el área de los poros,

como el diámetro de estos, para compararlos con los recomendados para una buena citocompatibilidad, para así determinar la viabilidad de los injertos.

Las probetas presentan gran cantidad de poros, algunos de ellos interconectados, además de un número importante de microporos, los cuales están distribuidos aleatoriamente por toda la superficie.

La figura 4 muestra mediciones del área y diámetros poros representativos en la superficie, tanto de la probeta fabricada con la mezcla (4A), como del chip de hueso esponjoso (4B).

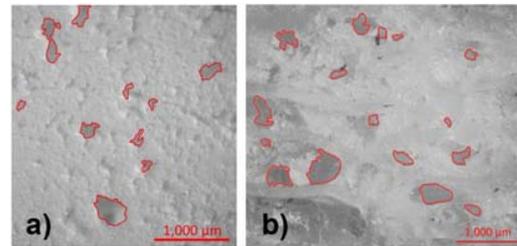


Fig. 4. A) Micrografía de la probeta fabricada con la mezcla, y B) Micrografía de un chip de hueso esponjoso.

En lo que respecta a la dureza, una vez se hubieron realizado las indentaciones pertinentes en cada probeta, se procedió a medirlas.

Como lo indica la norma ASTM E384 [9], se realizaron 3 indentaciones en cada probeta. Posteriormente se calcularon los promedios de las diagonales de las indentaciones, y se obtuvo un promedio por probeta, para después calcular la dureza correspondiente con ayuda de la ecuación 1.

La figura 5 muestra las indentaciones realizadas en la probeta fabricada con la mezcla, así como en el chip de hueso cortical.

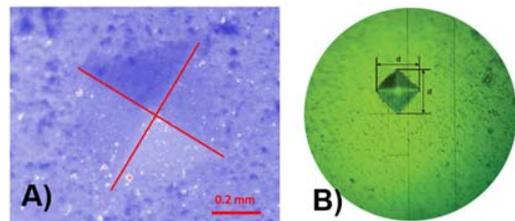


Fig. 5. Micrografía de las indentaciones realizadas tanto en la probeta fabricada con la mezcla (A), como en un chip de hueso cortical (B).

Finalmente, a modo de resumen, la Tabla 1, muestra los diferentes promedios de los poros, así como la dureza calculada en cada probeta.

TABLA I

MEDIDAS DE POROS Y DUREZA CORRESPONDIENTE

Probeta	Promedio del diámetro (µm)	Promedio del área (µm ²)	Dureza Vickers (HV)
Probeta fabricada con la mezcla	152.57±54.08	34,727.05	37.55
Hueso humano	215.67±103.65	51,922.69	50.2

IV. DISCUSIÓN.

Se comprobó la viabilidad de la síntesis de HA y β-TCP, por un método de precipitado con Ca(OH)₂ y H₃PO₄, como precursores y un posterior tratamiento térmico de 800°C. Además, dicha hidroxiapatita, presenta una relación Ca/P de 1.52, por lo que es una hidroxiapatita carbonatada y, por ende, semejante a la de los huesos humanos [11]. La apatita biológica es comúnmente deficiente de calcio y el carbonato es un sustituto para los grupos fosfato, por esta razón es llamada “apatita carbonatada”, que, aunque tiene una estructura de apatita, la relación Ca/P puede variar desde 1.67 hasta 1.33[11-12].

En los biocerámicos de fosfato de calcio, la presencia de poros con un diámetro promedio en el rango de 200-400 µm favorece la invasión de los vasos sanguíneos e induce la migración, adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos [13]. Los poros obtenidos en las probetas se encuentran dentro de dichos límites, además se sabe que la probeta presenta interconexiones de poros, lo cual es un factor importante para la proliferación de osteoblastos [12-13], por lo que es altamente prometedora para ser usada como injerto.

Los espectros DRX, mostraron que las propiedades del material que se usa para las impresiones de los andamios, en efecto tiene parecido al hueso, más que eso, tiene la misma composición y estructura que el mismo.

El análisis FTIR, viene a corroborar y apoyar lo antes dicho, ya que los grupos funcionales que se presentan principalmente en todos los materiales son los mismos, presentando únicamente variaciones en la intensidad de algunos, los cuales se deben a la parte orgánica del hueso.

V. CONCLUSIÓN.

Los resultados tanto químicos, como físicos, arrojaron que el material sintetizado, si bien no es idéntico al hueso, es similar. Por lo que, en base a la bibliografía, esto es muy prometedor para la biocompatibilidad, sin embargo, esto no se puede corroborar, por lo que el siguiente paso es realizar pruebas de biocompatibilidad y rechazo biológico.

RECONOCIMIENTOS.

Los autores Guzmán-Ariza y Díaz-León agradecen a CONACYT por la beca otorgado para realizar los estudios de posgrado (convenio 466009 y 473353 respectivamente). También se agradece al M.C. Francisco Javier Franco Aguilera por el apoyo en la realización de las pruebas. Proyecto financiado por la convocatoria de Apoyo a la investigación científica y Tecnológica 2018 para los Institutos Tecnológicos Federales y Centros (Clave 6413.18-P).

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Yang Y, Magnay J, Cooling L, Haj A. Development of a ‘mechanically active’ scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 23(10):2119-2126. 2002. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00342-8.
- [2] Gil-Albarova J, Garrido-Lahiguera L, Salinac A, Roman J, Bueno-Lozano AL, Gil-Albarova R. The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials* 25(19):4639-4645. 2004. DOI: doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.009.
- [3] Varanasi VG, Ilyas A, Kramer PR, Azimaie T. In vivo live 3D printing of regenerative bone healing scaffolds for rapid fracture healing. *US Patent 0143831*, Mayo 25, 2017.
- [4] Joshi, A. Process planning for the rapid machining of custom bone implants. Iowa State University, 2011.
- [5] Fathi M, Hanifi A, Mortazavi V. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology* 202(1-3):536-542. 2008. DOI: 10.1016/j.jmatprotec.2007.10.004.
- [6] He Z, Ma J, Wang C. Constitutive modeling of the densification and the grain growth of hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 26(14):1613-1621. 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.027.
- [7] Ducheyne P. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20(23-24):2287-2303. DOI: 10.1016/s0142-9612(99)00181-7.
- [8] Leukers B, Gülkan H, Irsen S, Milz S, Tille C, Schieker M, Seitz, H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16(12):1121-1124. 2005. DOI: 10.1007/s10856-005-4716-5.
- [9] E 384, Standard Test Method for Microindentation Hardness of Materials. ASTM Standard 2004.
- [10] Evans E. Toxicity of hydroxyapatite in vitro: the effect of particle size. *Biomaterials* 12(6):574-576. 1991. DOI: 10.1016/0142-9612(91)90054-e.
- [11] Hench L., Wilson J., “Introduction” en *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific Press, NY, 2013, pp. 1-26. DOI: 10.1142/9781908977168_0001
- [12] Yubao L, Klein C, De Wijn J, Van De Meer S, De Groot K. Shape change and phase transition of needle-like non-stoichiometric apatite crystals. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(5):263-268. 1994. DOI: 10.1007/bf00122395.
- [13] Lu JX, Flautre K, Gallur A, Descamps M, Thierry B, Hardouin P. Study of porous interconnections of bioceramic on cellular rehabilitation in vitro and in vivo. *Bioceramics*:583-586. 1997. DOI: 10.1016/b978-008042692-1/50138-2.