

Efecto de la adición de biovidrio e hidroxiapatita en ácido poli-L-láctico sobre la adsorción superficial de fosfatos

Effect of the addition of bioglass and hydroxyapatite in polylactide acid on surface adsorption phosphates

Hugo A. Estupiñán D.¹, Darío Y. Peña B.¹, Custodio Vásquez Quintero^{1*}, Dionisio Laverde Cataño¹,
Luz Amparo Lozano Urbina¹, Juan Carlos Jaimes²

¹Facultad de Ingeniería, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga Colombia

²Director de Investigaciones Quirúrgicas Especializados S.A * custodio@uis.edu.co

Fecha de recepción del artículo 15/11/2009; Fecha de aceptación del artículo: 15/12/2009

Resumen

En este trabajo se evaluó la interacción entre la hidroxiapatita (HAP), el biovidrio y el ácido poliláctico (PLA), los cuales fueron sintetizados por métodos de precipitación acuosa (HAP), sol-gel (Biovidrio) y Policondensación (PLA); estos precursores fueron evaluados por FTIR, DRX, DSC, mezclándose posteriormente (PLA-biovidrio y PLA-hidroxiapatita) para su análisis de biomineralización a nivel de laboratorio, con el fin de determinar cuál de estas mezclas de materiales presentó una mejor respuesta a la oseointegración en presencia de fluidos del cuerpo humano. Las mezclas con diferentes porcentajes de polímero y cerámico fueron sumergidas en SBF (solución corporal simulada) por periodos de siete, catorce y veintiún días. Las pruebas de biomineralización han sido realizadas en fluido corporal simulado (SBF) y evaluadas por medio de la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). Se estableció una comparación entre las resistencias a la polarización de las distintas muestras obtenidas a diferentes días de inmersión en SBF, donde se logró la mejor condición favorable a los catorce días de inmersión en SBF para las dos mezclas estudiadas, siendo la mezcla PLA/HAP la de mayor resistencia a la polarización, y por tanto la de mejor efecto de Biomineralización. La morfología de las mezclas se evaluó a partir de análisis de SEM-EDS.

Palabras clave

Hidroxiapatita, biovidrio, Ácido Poli L-láctico (PLA), biomineralización.

Abstract

The interaction between hydroxyapatite (HAP), the bioglass and polylactic acid (PLA), which were synthesized by aqueous precipitation methods (PAH), sol-gel (bioglass) and polycondensation (PLA) was evaluated; These precursors were evaluated by FTIR, DRX, DSC, and then were mixed (PLA –Bioglass and PLA-hydroxyapatite), for the biomineralization effect analysis, to determine which one of this mixtures of materials present a better response to the osteointegration in presence of Human Body Fluids. The mixtures with different percentages of polymeric and ceramics were submerged in SBF (Simulated Body Fluid) by periods of seven, fourteen and twenty-one days. The tests of biomineralization were carried out in solution SBF by using electrochemical Impedance spectroscopy technique (EIS). A comparison between the polarization resistances of the different samples, obtained in different days of immersion in SBF was obtained; the best condition favorable was for fourteen days of immersion in SBF for the two mixtures studied; where the PLA/HAP sample showed the highest polarization resistance and hence, better effect to the biomineralization. The morphology of the mixtures was evaluated by using the analysis by SEM-EDS.

Key Words

Hydroxyapatite (HAP), Bioglass, Poly L- lactic Acid (PLA), Biomineralization.

Introducción

El gran número de aplicaciones que poseen los biomateriales, se han manifestado de manera significativa por el desarrollo de nuevas propiedades, por las cuales se ha dado facilidad en el diseño, manufactura, e investigación, de acuerdo a los requerimientos de la medicina en sus diferentes áreas; es indispensable hacer énfasis en una condición que está íntimamente relacionada con la buena implementación de cualquier biomaterial, la biocompatibilidad, la cual es una condición que se define como de aceptabilidad biológica, ya que esta corresponde a la interacción de los biomateriales con los tejidos del cuerpo humano.

Las primeras interacciones entre la superficie del biomaterial y el entorno biológico, ocurren apenas algunos segundos después de su implantación en el cuerpo y se hacen, con las proteínas presentes en el medio fisiológico. Es sólo después de esta primera etapa cuando los neutrófilos y los macrófagos (las células que intervienen en primera instancia en todos los procesos de inflamación) llegan a la superficie del material. Estas células desencadenan entonces, complejos procesos biológicos de biomineralización. Este proceso constituye la respuesta biológica que, en función de las células reclutadas posteriormente, llegará a la aceptación del biomaterial en el tejido, o a su rechazo.

Por una parte, la naturaleza de la monocapa de proteínas adsorbida en la superficie del material constituye el factor clave de esta respuesta celular. Las células dependen de proteínas específicas para adherirse y comunicarse. En particular, los osteoblastos necesitan interacciones específicas con la superficie del biomaterial para poder expresar un fenotipo diferenciado. Estas interacciones dependen de la cantidad, naturaleza y conformación de las proteínas adsorbidas en la superficie del material.

Por otra parte, las características superficiales del material, como la composición química o la energía superficial, determinan la naturaleza de la adsorción proteínica y particularmente,

la orientación y conformación de las proteínas adsorbidas. Además, las características físico-químicas, como las cargas superficiales y/o la energía superficial del material, así como su topografía, pueden influenciar indirectamente (a través de la capa proteínica) y/o directamente en el comportamiento celular [1]. La adsorción es un medio para neutralizar o satisfacer las fuerzas de atracción que existen en una superficie o una interfase, las cuales se deben a la discontinuidad en la naturaleza de la estructura superficial. En consecuencia la adsorción produce una disminución de la energía libre interfacial [2].

La capacidad de adsorción está definida con base en las isotermas de adsorción en disolución. La isoterma de adsorción es la relación de dependencia, a una temperatura constante, de la cantidad de adsorbato adsorbido por peso unitario de adsorbente, con respecto a la concentración del adsorbato en equilibrio. Una de las hipótesis más útiles en adsorción, es la de Langmuir, el cual postuló, que en la adsorción, donde predominan las fuerzas de tipo químico, se forman capas monomoleculares del adsorbato sobre el sustrato adsorbente y se fundamenta sobre ciertas suposiciones [2]: que la superficie sea homogénea, que ambos, el soluto y el solvente, ocupen la misma área por molécula adsorbida o por sitio interfacial, que no existan interacciones laterales, es decir que la energía de desorción sea constante y que la adsorción máxima corresponda a una monocapa monomolecular.

El modelo de Langmuir se ha adoptado con frecuencia para explicar el proceso de adsorción de una proteína en un sitio específico sobre un adsorbente de afinidad. En este modelo, el adsorbente de afinidad es visualizado como un material que tiene un número de sitios no activos idénticos sobre su superficie el cual puede aceptar solamente una simple molécula de soluto [3].

Esta investigación tuvo por objeto evaluar la biomineralización del PLA-Biovidrio y el PLA-HAP mediante SEM-EDS y Espectroscopia de Impedancia Electroquímica. Para este estudio se obtuvieron tres precursores de biomateriales, uno polimérico (ácido poliláctico PLA) y dos cerámicos

biovidrio e hidroxiapatita HAP; el material polimérico se obtuvo por medio del método de policondensación con condiciones de presión, temperatura y porcentaje de catalizador adecuadas para lograr un material con características favorables para el proceso requerido; la obtención de biovidrio fue realizada por el método sol-gel, el cual permite la elaboración de vidrios bioactivos con propiedades texturales (superficie específica y porosidad) muy superiores a los obtenidos por el método de fusión, empleando como precursores, el sistema bifásico CaSiO_2 , debido a su alta bioactividad. La hidroxiapatita se obtuvo por medio del método de precipitación acuosa, teniendo en cuenta ciertas condiciones de pH, el orden en que se agregaron los reactivos y el tiempo de reposo para la formación de hidroxiapatita pura y cristalina (4).

Las mezclas de estos materiales se realizaron con la ayuda de un disolvente y con la temperatura adecuada, para obtener condiciones de homogeneidad. Luego se realizó una comparación de la biomineralización entre las mezclas (PLA/Biovidrio y PLA/HAP) a nivel de laboratorio, en la cual se evaluó el crecimiento de la apatita, realizando un seguimiento a los tiempos de biomineralización (0, 7, 14 y 21 días), con el fin de determinar, la mejor respuesta a la oseointegración en presencia de fluidos del cuerpo humano.

Materiales y métodos

Se sintetizaron materiales de hidroxiapatita, biovidrio y ácido Poliláctico, los cuales fueron caracterizados por DRX, FT-IR y DSC, siendo estos los precursores utilizados en las mezclas de PLA/HAP y PLA/Biovidrio con diferentes porcentajes de polímero-cerámico (5). La síntesis de la hidroxiapatita se realizó por medio del método de precipitación acuosa, debido a que, en la síntesis por el método sol-gel, no se presentaron resultados satisfactorios de cristalinidad por DRX. Las soluciones iniciales se prepararon con nitrato de Calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y Fosfato de amonio $\text{H}_2(\text{PO}_4)\text{NH}_4$ en concentraciones 1M y 0.48M respectivamente, adicionados en relación molar de 1,67 (6). Las soluciones se basificaron

con hidróxido de amonio y agitación continua durante 3 horas para obtener un pH de 9,8 a 10, permaneciendo la solución en envejecimiento por 24 horas a 25°C; y a secado por 24 horas a 60°C. Luego se realizó una calcinación por una hora a 1050°C (6). La técnica de DRX permitió la evaluación de la estructura química y cristalina de los fosfatos de calcio, logrando identificar los patrones de difracción de las diferentes fases que se formaron durante la síntesis, determinando la pureza de la fase HAP (7).

La síntesis del biovidrio se obtuvo por el método sol-gel; según otros autores, el biovidrio sintetizado por este método, presenta características bioactivas (8). Se utilizaron, silicato de calcio y agua como precursores. La solución de sol-gel, se envejeció por 3 días a 25°C, sometiendo a secado por 6 días a 70°C y 150°C en presencia de aire. Luego se realizó un proceso de molienda y secado a 70°C. La identificación del producto se hizo por FT-IR.

El ácido poliláctico se sintetizó por policondensación del ácido láctico con catalizador Zn^{+2} , con las siguientes etapas: deshidratación, temperatura de 100°C por 2 y 3 horas y presión atmosférica; esterificación a 180°C de 6 a 7 horas y presión de 100 mmHg; oligomeración, a 180°C, por 20 a 30 horas con una presión de 25 mmHg; por último se realizó la policondensación a 180°C por un periodo de 5 horas y 10 mmHg de presión, variando condiciones en la etapa de oligomeración y % de catalizador; obteniendo el ácido poliláctico como producto final en cuatro tipos de polímeros. La figura 1 muestra la elaboración de la mezcla de PLA/HAP, a la cual se adicionó HAP al ácido poliláctico mientras fue realizado un calentamiento a 150°C, la cual es una temperatura menor a la temperatura de fusión del ácido poliláctico. Con porcentajes de mezcla de 5 y 10% de hidroxiapatita en ácido poliláctico y de biovidrio de 10 y 30%, se obtuvieron mezclas homogéneas, las cuales fueron vertidas en una coquilla para obtener las muestras de ensayo.

Para la etapa de biomineralización, se preparó una solución simulada del fluido corporal (SBF), variando la concentración de calcio (3,08mmol/L

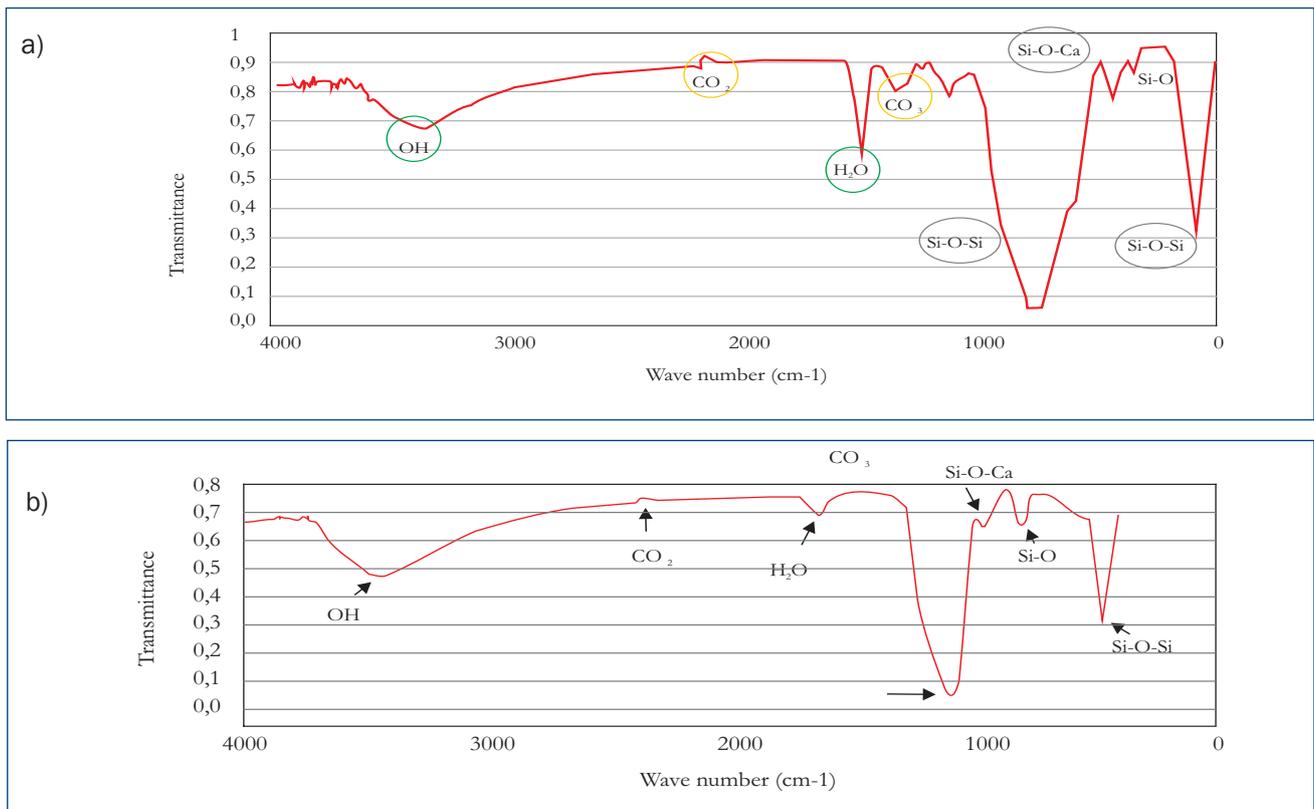


Figura 3. FT-IR del Biovidrio, a) obtenido por sol-gel en laboratorio, b) obtenido por Pappas *et al*

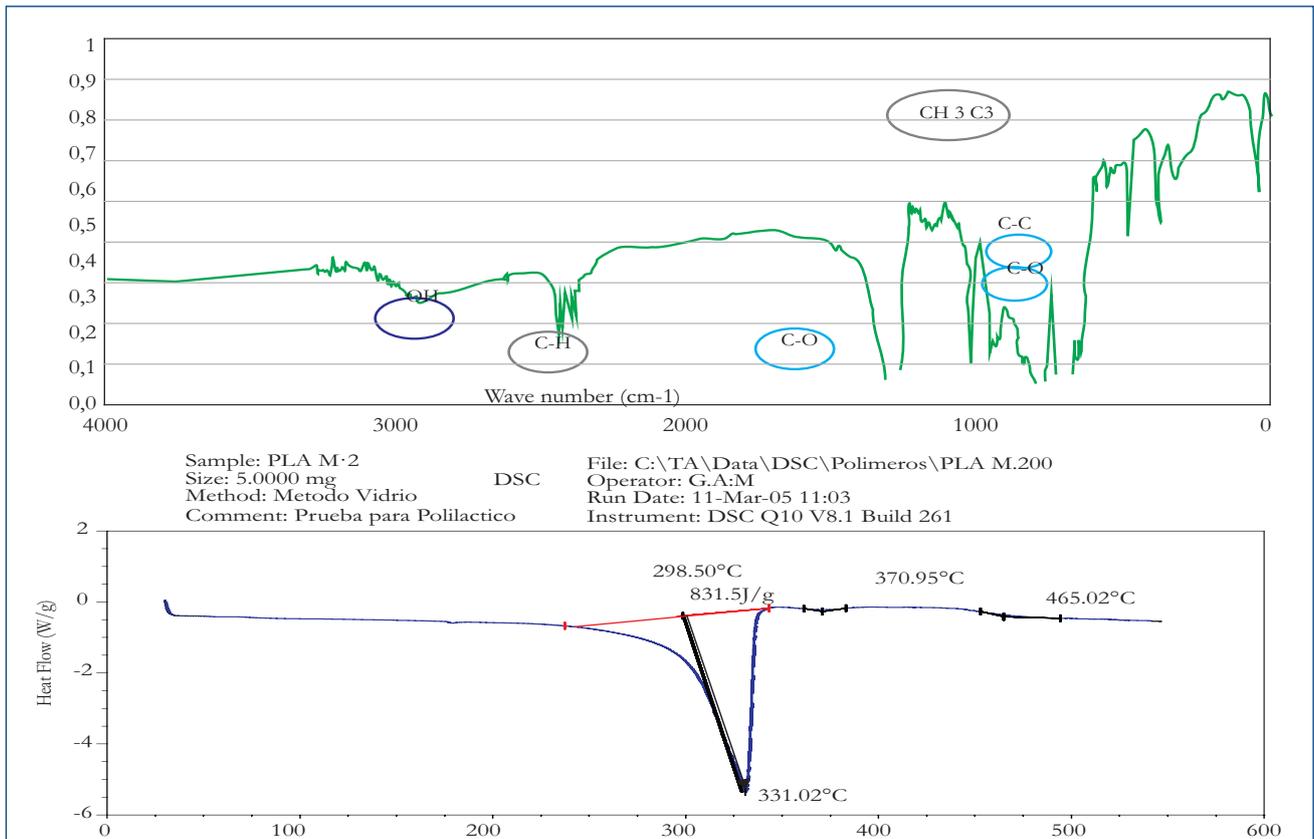


Figura 4. Espectro FT-IR del ácido poliláctico obtenido y espectro DSC.

y 1200 cm^{-1} se encuentra otro pico sobresaliente que indica la presencia de un enlace C-C en el polímero.

En la figura 5 se muestran los espectros de impedancia obtenidos al variar la temperatura y la concentración de calcio en el medio simulado SBF.

Para el análisis del diagrama de bode, se dividieron los espectros en dos regiones de frecuencias: altas [10^5 - 10^3], y bajas [10^0 - 10^2], en donde se identificaron dos constantes de tiempo. La constante de tiempo a bajas frecuencias [10^0 - 10^2] Hz muestra las diferencias en los procesos de adsorción en las cuales, los ángulos de fase variaron entre 40° y 50° , lo cual es típico de

comportamientos resistivos en un proceso de adsorción en disolución, a excepción de la mezcla PLA/HAP, la cual se presentó a una concentración de 4.63mmol/L de iones de Ca^{+2} y 45°C , con un ángulo de fase de 95° , mostrando un comportamiento más capacitivo en la interfase electrodo-electrolito SBF. A frecuencias altas [10^5 - 10^3] Hz, las constantes de tiempo corresponde a procesos de transferencia de carga, y los ángulos de fase a estas frecuencias mostraron un comportamiento capacitivo. Un modelo de circuito equivalente con dos constantes de tiempo en paralelo se muestra en la figura 6, cuyos elementos resistivos y capacitivos constituyen el comportamiento electroquímico de las mezclas, identificando cada constante de tiempo.

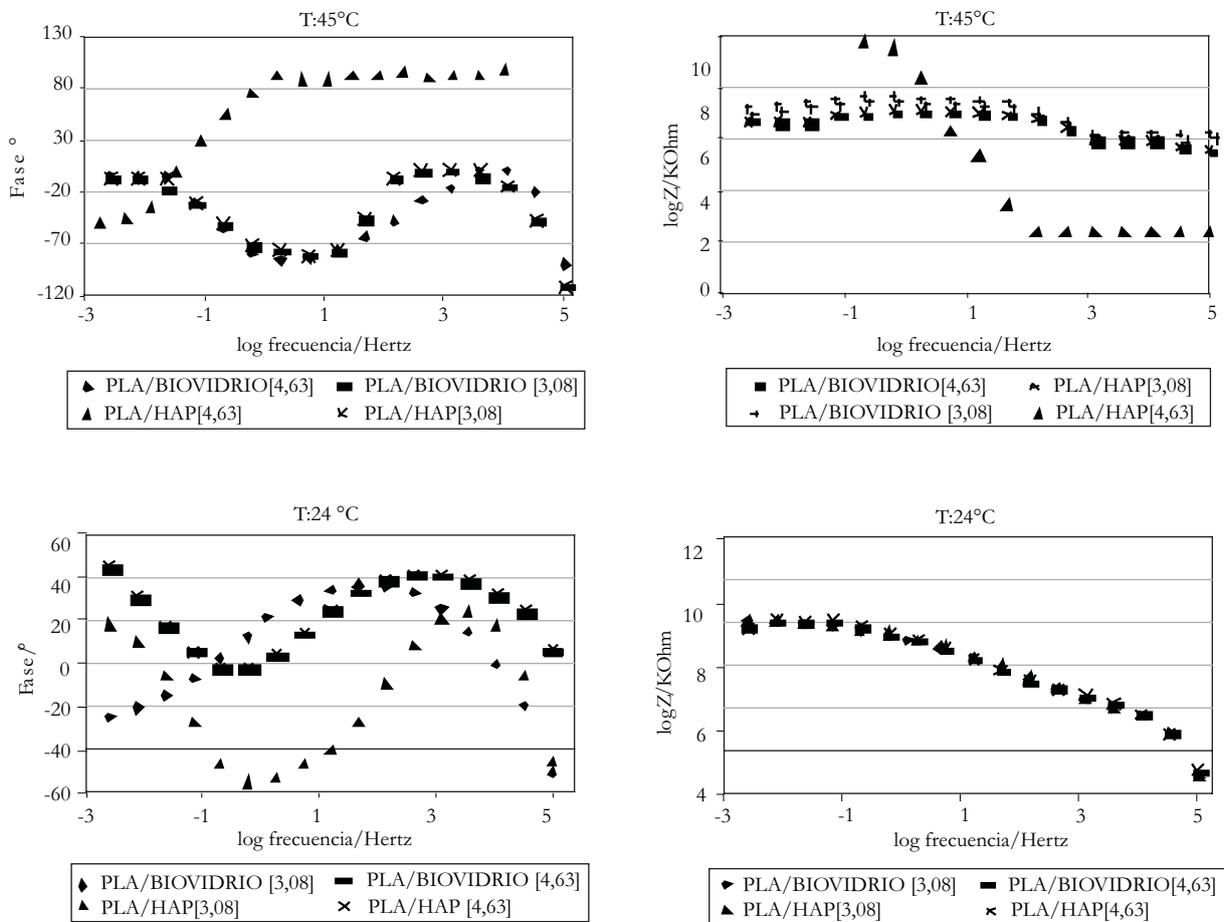


Figura 5. Espectros de bode a $T: 45^\circ\text{C}$ y $T: 24^\circ\text{C}$, variando la concentración de Ca^{+2}

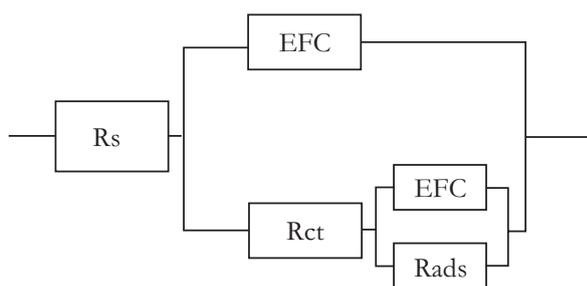


Figura 6. Circuito equivalente para el proceso de adsorción

Este circuito equivalente describe dos sistemas RC en paralelo, en los cuales se hace énfasis principalmente a un elemento de fase constante y una resistencia de transferencia que describe la adsorción de la monocapa de apatita en disolución. Utilizando los valores de los elementos resistivos del análisis electroquímico por ajuste al modelo de circuitos equivalentes planteado, se obtuvieron los datos termodinámicos que describen el proceso de adsorción; para estudiar la influencia en la variación de la temperatura y la relación Ca/P de las mezclas se prepararon soluciones SBF con diferentes relaciones de Ca/P (10)

Los valores de $R_{ct_{ads}}$ y C de las mezclas se ajustaron a la isoterma de Langmuir, la cual es válida para la adsorción de capa simple.

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{B_{ads} \Gamma_{max}} + \frac{c}{\Gamma_{max}} \quad (1)$$

Conociendo la proporcionalidad que existe entre Γ y $1/R_{ct_{ads}}$ se graficó la concentración de iones de Ca^{+2} (C) Vs $R_{ct_{ads}} * C$, donde los valores de Γ pueden ser calculados a través de la pendiente, y el

valor de B_{ads} es mostrado en el intercepto con el eje de las ordenadas. De las gráficas, C vs $R_{ct_{ads}} * C$, para las mezclas a varias temperaturas, resultaron los siguientes valores termodinámicos, mostrados en la tabla 1.

Se obtuvieron valores de ΔG y ΔH negativos, indicando un proceso de adsorción espontánea sobre la superficie de los compuestos y una reacción exotérmica con respecto al fenómeno de adsorción, el aumento de la temperatura desfavorece la adsorción para la mezcla PLA/Biovidrio y en el caso de PLA/HAP ocurre lo contrario, atribuyéndose a los cambios estructurales de la molécula de HAP. En general, la capacidad de adsorción es superior el PLA con adición de hidroxiapatita.

La Espectroscopia de Absorción Atómica se uso para definir la concentración de calcio adsorbido por las probetas con porcentajes de PLA/HAP (95/5) y PLA/Biovidrio (90/10). La tabla 2 muestra que la mezcla de PLA/Biovidrio posee mayor adsorción con respecto a la de PLA/HAP, esto indica que al sumergir la probeta en SBF variando la concentración de iones Ca^{+2} , la probeta de PLA/Biovidrio con porcentaje 90/10, contiene en su superficie mayor concentración de iones que su estado inicial.

Estos resultados corroboran los obtenidos de capacidad de adsorción y los cambios en la entalpía de formación obtenidos a partir del análisis de EIE, en los cuales la modificación con HAP en el PLA, presentó mejores resultados de adsorción.

Para evaluar la biomineralización, o la capacidad de las mezclas de PLA-HAP y PLA-Biovidrio, de formar una capa de apatita sobre su superficie o

Tabla 1. Parámetros termodinámicos calculados de los diagramas de EIE

Mezcla	T °C	Γ_{max}	Bads(L/mol)	$\Delta G(KJ/mol)$	$\Delta S(KJ/mol^{\circ}k)$	$\Delta H(KJ/mol^{\circ}k)$
PLA / Biovidrio	24	0,00174	155,6	-25,01	0,0386	-13,54
	45	0.0029	172.32	-24.20		-11.92
PLA/HAP	24	0.00019	372.07	-24.55	-0.0781	-51.02
	45	0.000037	365.39	- 26.19		-47.19

Tabla 2. Concentración absorbida de calcio, volumen 40ml T: 37 °C.

Concentración de Ca ⁺² en SBF	Antes de la Inmersión en SBF (ppm.)	Inmersión en SBF de HAP/PLA (ppm.)	Inmersión en SBF de Biovidrio/PLA (ppm.)
3,08mmol/L	2,829	2,238	2,631
% error	2,7	1,96	1,28
4,63mmol/L	2,9629	2,200	2,945
% error	0,53	0,6	1,49

incrementar la cantidad de los ya presentes, sobre la morfología y algunas propiedades electroquímicas, se realizaron análisis por SEM y EIE a las muestras de trabajo, las cuales permanecieron en SBF por 0, 7, 14 y 21 días de inmersión, a 37 °C.

El efecto en el tiempo de biomineralización se evaluó, relacionando este parámetro, con los valores de resistencia a la polarización Rp, obtenidos de los ensayos de EIE a 0, 7, 14 y 21 días de permanencia en SBF, en la figura 7 se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos.

Se observa que la Rp es baja a los 7 días de inmersión en las mezclas de PLA/HAP y PLA/Biovidrio, pero ligeramente más alta en el mezcla PLA/HAP, lo cual indica que hay un predominio de disolución de iones de calcio de la mezcla, sobre la adsorción de iones del medio SBF, por el contrario a los 14 días se observa un máximo en el valor de la Rp para las dos mezclas, predominando la adsorción de los iones de calcio y fósforo presentes en el fluido simulado para formar una capa de apatita, sobre la disolución del material de

la mezcla. A los 21 días decrece la resistencia a la polarización, al degradarse la capa formada debido a las propiedades de disolución del PLA (11).

La biomineralización dependiente de la variación en la resistencia a la polarización, son manifestaciones que se generan por la formación de un producto, que por su naturaleza morfológica, estructural o química, permite o restringe la conducción electrónica, disminuyendo o aumentando la resistencia a la transferencia de carga. Con respecto a los grupos silanol (PLA/Biovidrio), los cuales son iónicos y de alta energía, disminuyen la resistencia a la transferencia de carga, razón por la cual, se transforma en un compuesto activo, indicando una señal de bioactividad. Por el contrario cuando se presentan valores de resistencia más altos, se presenta menos actividad y menos capacidad iónica, indicando, en este caso, que es un compuesto estequiométricamente más estable. En el caso de PLA/HAP, lo grupos que podrían apreciarse, son fosfatos de calcio iónicos, los cuales atraen cationes de calcio para dar lugar a la apatita, o a algún fosfato estequiométrico.

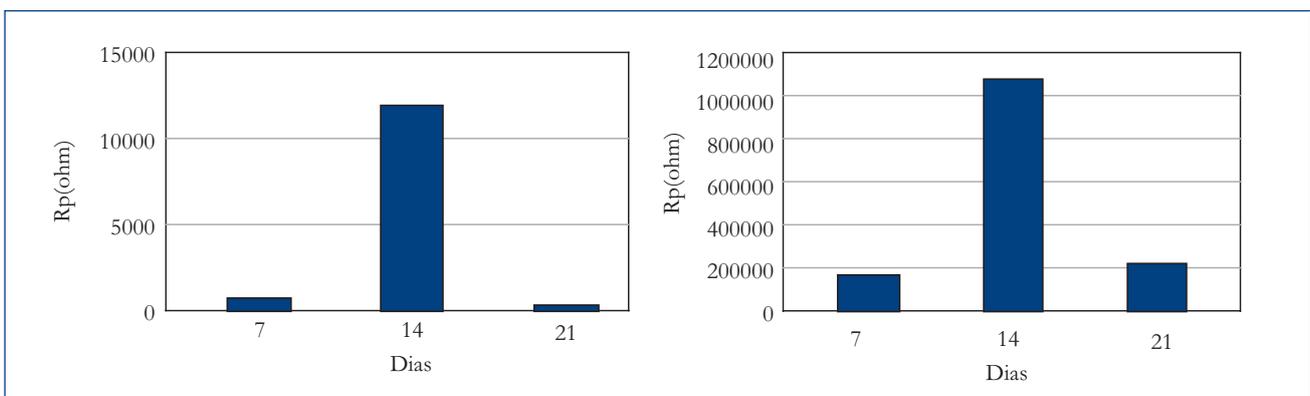


Figura 7. Comparación del efecto de la biomineralización de a) PLA/ Biovidrio y b) PLA/HAP.

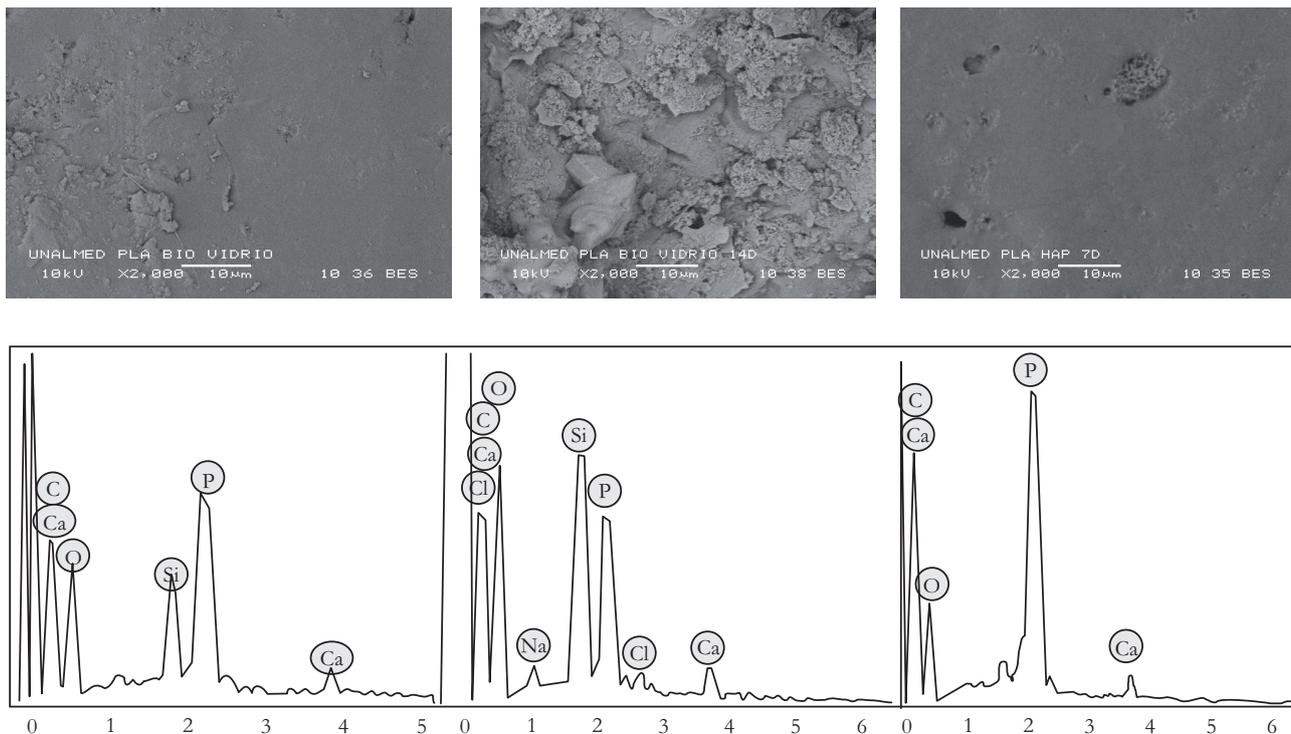


Figura 8. Micrografías de SEM y análisis por EDS, de muestras sumergidas en SBF: (a) PLA/Biovidrio 7 días, (b) PLA/Biovidrio 14 días y (c) PLA/HAP 7 días.

En la figura 8, se muestra la morfología de algunas muestras sumergidas en SBF.

En la figura 8(a) se observa la formación de fosfato de calcio por la técnica de EDS y se aprecia una superficie poco porosa, e irregular, careciendo de sitios activos, a diferencia de los catorce días de inmersión, figura 8(b), en la cual la superficie de la mezcla PLA/Biovidrio, cambió de manera significativa, a más porosa e irregular en presencia de fosfato de calcio. Respecto a la figura 8(c), de la muestra de PLA/HAP, los resultados obtenidos por SEM y EDS, evidencian el crecimiento de fosfato de calcio, a pesar del poco tiempo de inmersión en SBF.

Conclusiones

Se presentó un máximo de resistencia a la polarización en los ensayos de inmersión en SBF para la mezcla PLA/HAP, atribuyéndose a la formación de una monocapa de fosfato de calcio,

con mayor estabilidad, comparada con la mezcla PLA/Biovidrio. Por esta razón se considera que la mezcla de PLA/HAP presentó un mayor efecto de biomineralización, lo cual también fue corroborado con el análisis por SEM-EDS.

La utilización del método Sol-Gel para la síntesis del Biovidrio, Precipitación Acuosa en la obtención de la HAP y Policondensación para la elaboración del PLA, mostraron resultados satisfactorio con respecto a los materiales esperados para la fabricación de las mezclas PLA/HAP y PLA/Biovidrio.

Los resultados termodinámicos obtenidos a partir del análisis de las constantes de tiempo de los diagramas de impedancia en los ensayos con SBF a diferentes temperaturas y concentración de calcio, fueron corroborados satisfactoriamente con las pruebas de absorción atómica de iones calcio en solución, comparadas al inicio y al final de los ensayos electroquímicos.

Agradecimientos

El GIC expresa sus sinceros agradecimientos a Colciencias por la financiación del presente proyecto contrato 055 de 2008.

Bibliografía

H, S. Jamshidi, K. Ikada, Y. “Synthesis of polylactides with different molecular weights. Biomaterials” (1997).

Mostaffa, N. “Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. Materials chemistry and physics.” (2005).

Zwiers RJM, Gogolewski S, Pennings AJ. “General Crystallization Behavior of Poly(LLactic Acid) PLLA .2. Eutectic Crystallization of PLLA. Polymer” (1983).

C. García, C. Paucar. “Study of some parameters that determine the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route” (2006).

5. M. E. Navarro. “Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea”. Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias. Especialidad Ingeniería Química por la Universidad Politécnica de Catalunya. 2005.

6. M. E. Londoño, A Echavarría, F. de la calle, “Características cristaloquímicas de la Hidroxiapatita sintética tratada a Diferentes temperaturas”, Revista EIA, Número 5 p. 109-118. 2006.

7. V. J. Shurtleff, L.L. Hench: “Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair”. J. Mater. Sci. 38, 2003, 4697

8. M Valleg Regi. Monografía xix “Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas, 2001, pp.85-89.

9. G.S. Pappas, P. Liatsi, I.A. Kartsonakis, I. Danilidis; Synthesis and characterization of new SiO₂-CaO hollow nanospheres by sol-gel method: Bioactivity of the new system; Journal of Non-Crystalline Solids 354, 2008 pp. 755-760.

10. E. M. Camargo González, C. A. González Santos, Trabajo de Grado “Evaluación electroquímica de substratos de Ti6Al4V con recubrimiento anódico y de fosfato de calcio en suero fisiológico”, 2005.

11. J. M. Fuentes Torres, Trabajo de Grado, “Efecto del tratamiento alcalino sobre el comportamiento electroquímico de un recubrimiento de biovidrio basado en SiO₂- P₂O₅-CaO-Na₂O obtenido por anodizado por plasma químico sobre Ti6Al4V” 2008.