



Formación de hidroxiapatita sobre una superficie polimérica por un método biomimético

Martínez-Pérez CA*
Martínez-Villafañe A*
Romero-García J**

* División de Deterioro de Materiales,
Centro de investigación en Materia-
les Avanzados S.C. Calle Miguel de
Cervantes No. 120, Chihuahua, Chih.
México, C.P. 31109, Tel. (1) 43 911 11,
Fax (1) 43 911 12.

** Departamento de Biopolímeros,
Centro de Investigación en Química
Aplicada, Blvd. Enrique Reyna No.
140, Saltillo, Coah. México, C.P.
25000.

Artículo recibido 10/septiembre/2000

Artículo aceptado 3/enero/2001

RESUMEN

En este trabajo se estudió la formación de fosfato de calcio en la superficie de un polímero (poliuretano), la cual había sido tratada previamente con tetra etil orto silicato (TEOS) por la inmersión del poliuretano en un fluido fisiológico simulado (FFS) que es una solución con una composición de iones similar a la del plasma sanguíneo. Las técnicas de caracterización utilizadas fueron la microscopía electrónica de barrido (MEB), análisis de energía dispersiva de Rayos X (EDAX), y espectroscopia infrarrojo utilizando el modo ATR. Los resultados muestran que se formaron grupos silanol en la superficie del poliuretano cuando éste fue tratado con TEOS. Los polímeros fueron inmersos por diferentes periodos de tiempo en una solución 1.5 FFS. Todas las muestras desarrollaron apatita en sus superficies. La cantidad de calcio y fósforo fue determinada por el análisis con ICP y EDAX, dando como resultado una relación Ca/P de 1.6, este valor es cercano al de la apatita carbonatada; los resultados obtenidos por espectroscopia infrarrojo confirman que se trata de apatita carbonatada similar a la apatita biológica o del hueso.

Palabras clave:

Poliuretano, Apatita carbonatada, Biomimético.

ABSTRACT

Biomimetic growth of calcium phosphate compound on porous polyurethane (PU) treated with tetra ethyl ortho-silicate (TEOS) and soaked in simulated body fluid solution was studied using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray analysis, and Fourier Transformed infrared spectroscopy-attenuated total reflectance (FTIR-ATR). Polyurethane was treated with TEOS in order to led to the formation of silanols groups which stimulated the growth of hydroxiapatite when immersed in simulated body fluid solution (SBF). Polyurethanes not treated with TEOS did not whow calcium phosphate growth upon immersion in SBF solution. The Ca and P determined by EDAX and inductively coupled plasma spectroscopy (ICP) analysis revealed that surface layer was no - stoichiometric hydroxiapatite, but carbonated - containing hydroxiapatite with Ca/P ratio of 1.5 - 1.6, this was confirmed with FTIR-ATR.

Key words:

Polyurethane, Hidroxiapatite, Biomimetic.

INTRODUCCIÓN

Los fosfatos de calcio, especialmente las apatitas, han sido estudiados como materiales biocompatibles para la reconstrucción y relleno de tejido óseo, así como en cementos dentales.¹ La hidroxiapatita sinterizada porosa es la más utilizada, este tipo de hidroxiapatita puede ser invadida con gran facilidad por los osteoblastos.² Sin embargo, la hidroxiapatita es frágil por naturaleza y su uso en la reconstrucción de hueso es limitado. Por lo tanto, su aplicación se ha enfocado al recubrimiento de metales como el titanio, acero y sus aleaciones, también se ha utilizado como material compuesto en plásticos y vidrios cerámicos.³⁻⁵ Básicamente la hidroxiapatita sinterizada no es biodegradable, por lo que la generación de hueso es limitada. Se han reportado varias clases de apatitas en sus mayoría diferentes a la apatita biológica, que es el principal componente de los tejidos duros como los huesos y los dientes.¹ La apatita biológica no tiene la misma composición que la hidroxiapatita teórica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) sino que contiene un porcentaje de CO_3^{2-} y trazas de otros elementos tales como Mg^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ , HPO_4^{2-} , F^- , Cl^- , etc., a este tipo de apatita también se le conoce como apatita carbonatada.

Se ha demostrado que la condición esencial para que un material artificial se una al hueso es la formación en su superficie de una capa de apatita biológicamente activa, similar a la del tejido óseo.⁶⁻⁸ Estudios recientes en el área de la química del biomimetismo han contribuido significativamente en la comprensión básica de algunas de las características físicas y químicas de las superficies de varios metales, las cuales puedan elevar o estimular la nucleación de fosfato de calcio in vitro o in vivo.^{9,10} Se ha encontrado que algunos materiales como el bioglass®, la hidroxiapatita sinterizada, y algunos vidrios cerámicos, se unen a través de una capa de apatita similar a la del hueso.^{11,12} En estos materiales se ha estudiado cómo afecta la formación de sílica gel, así como la función de los radicales silanol (Si-OH) en la formación y crecimiento de una capa de fosfato de calcio a partir de un fluido fisiológico simulado.^{13,14}

En este trabajo se presenta la formación de apatita del tipo óseo a partir de un fluido fisiológico simulado sobre la superficie de un poliuretano biodegradable y poroso el cual fue tratado con TEOS para proveerlos de Si y que la

superficie fuera susceptible a la nucleación y crecimiento de fosfato de calcio al sumergirlo en un fluido fisiológico simulado. Los resultados del crecimiento de fosfato de calcio sobre las superficies funcionalizadas inmersas por varios periodos de tiempo en 1.5 FFS son descritos. Para estudiar la naturaleza y el crecimiento de la capa de fosfato de calcio se utilizaron las técnicas de caracterización como microscopía electrónica de barrido (MEB), análisis de energía dispersiva de Rayos X (EDAX), espectroscopía infrarrojo y espectroscopía de plasma.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En 1,4 dioxano se disolvieron seis equivalentes de polycaprolactone diol (PM 1250) y dos equivalentes de polycaprolactone triol (PM 900). Una vez disueltos estos reactivos se agregó a la solución once equivalentes de 1,6 disocianato hexano. Como catalizador se agregó 0.5% del peso total de dibutiltin dilaurate. Para asegurar la separación de fases se agregó agua y como co-solvente c-hexano.

El medio de crecimiento 1.5 FFS se preparó por la disolución de los siguientes reactivos: NaCl , NaHCO_3 , KCl , K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , y Na_2O_4 en agua destilada para obtener las concentraciones que se muestran en el Cuadro 1. Estas soluciones fueron llevadas a un pH de 7.25 por la adición de tris-(hydroxymethyl)-aminomethane ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) y ácido clorhídrico 1M a 37 C.

Se cortaron piezas rectangulares de poliuretano de $2 \times 2 \times 0.5$ cm las cuales fueron colocadas dentro de un recipiente en el cual se le agregaron 40 mL de TEOS (99.9%). El recipiente se colocó en baño maría a una temperatura de 60°C por 3 horas. Después, las piezas de poliuretano fueron lavadas con alcohol etílico.

Cuadro 1. Comparación de la concentración iónica de un fluido fisiológico simulado con el plasma sanguíneo.

	Concentración (mM)							
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	HCO_3^-	Cl^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Plasma	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
FFS	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	148.0	1.0	0.5
1.5 FFS	213.0	7.5	3.75	2.25	6.3	222.0	1.5	0.75

Las muestras tratadas con TEOS fueron mantenidas en inmersión en una solución 1.5 FFS en recipientes de plásticos los cuales fueron mantenidos a 37 °C por diferentes periodos de tiempo, después del cual el poliuretano fue lavado con agua destilada y secado a temperatura ambiente. El medio de crecimiento se cambió cada 24 horas. La caracterización se llevó a cabo utilizando un MEB (Joel JSV 5900LV) al cual está adaptado un equipo EDAX. El análisis por espectroscopia infrarrojo se llevó a cabo en un equipo Magna-IR 750 II utilizando el modo ATR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de nuestros estudios muestran que una fase de fosfato de calcio (apatita biológica) puede crecer eficientemente en un poliuretano por la incubación en una solución con composición iónica similar a la del plasma sanguíneo. La figura 1a-e muestra las micrografías de las piezas de poliuretanos después de haber sido tratadas con TEOS e inmersas en SBF por 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días, respectivamente. La nucleación de fosfato de calcio comenzó desde el primer día. En

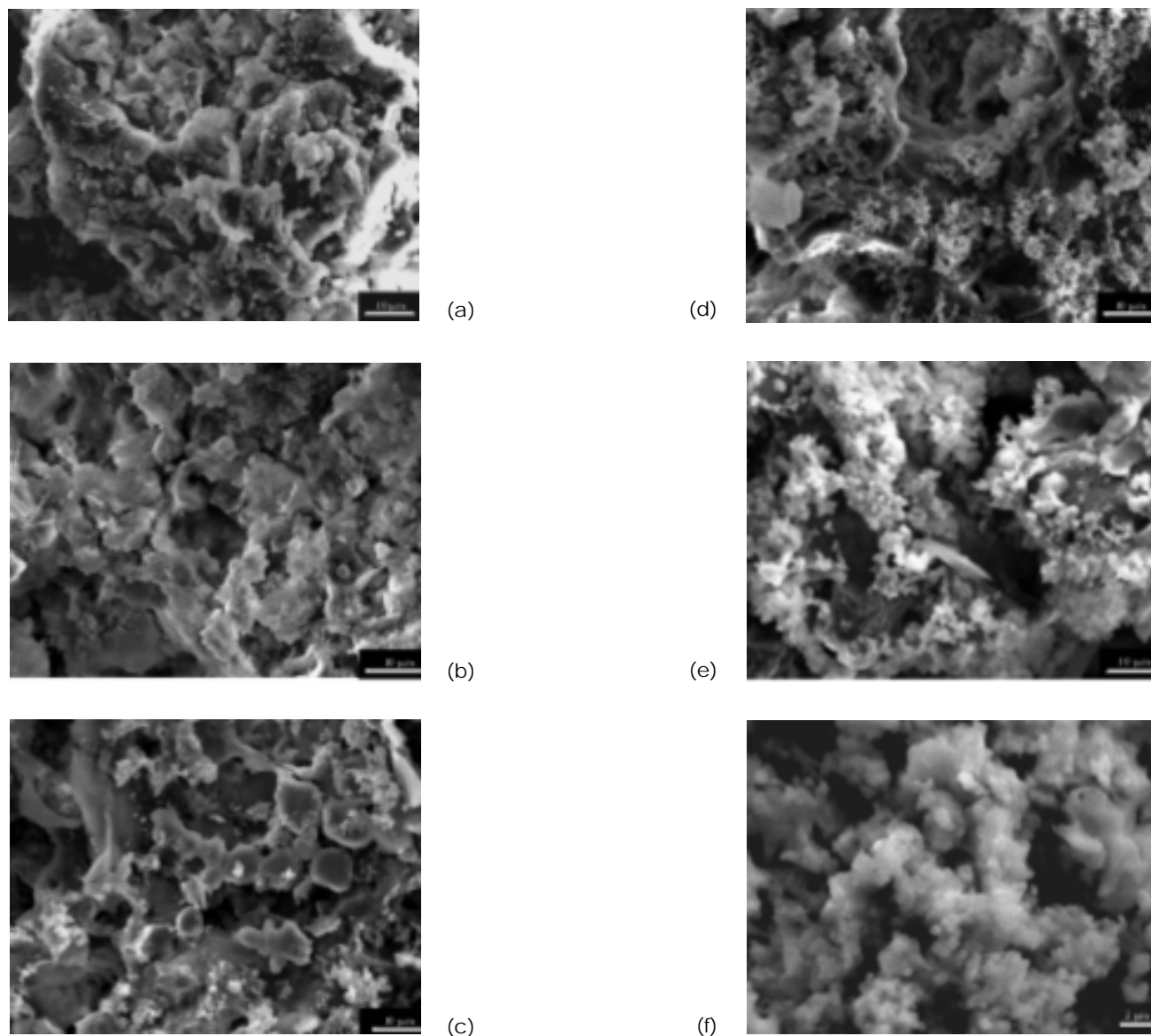


Figura 1. Micrografía del MEB de los poliuretanos inmersos en un fluido fisiológico simulado por diferentes periodos de tiempo (a) 24 h (b) 72 h (c) 120 h (d) 168 h (e) 336 h (f) ampliación de la micrografía 1e.

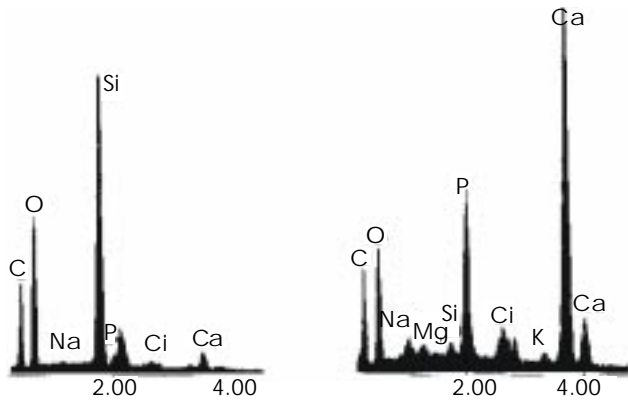


Figura 2. Espectros EDS de muestras de poliuretano tratadas con TEOS e inmersas en FFS por (a) 24 h y (b) 2 semanas.

la figura 1a se puede apreciar la formación de núcleos esparcidos en la superficie del poliuretano; este fenómeno en un principio es al azar. Conforme el tiempo de inmersión aumenta el poliuretano se empieza a cubrir en toda su superficie por más núcleos de fosfato de calcio (Figura 1e). Las muestras a las que no se les dio ningún tratamiento presentaron la aparición de pequeños núcleos de apatita, pero, sólo hasta después de 2 semanas de inmersión.

La morfología del recubrimiento es de partículas esféricas aglomeradas con pequeños cristales lo que sugiere una alta velocidad de nucleación, la formación de nuevos núcleos se da preferentemente en las partículas de apatita ya formadas, para dar una morfología similar a la coliflor tal como se puede apreciar.

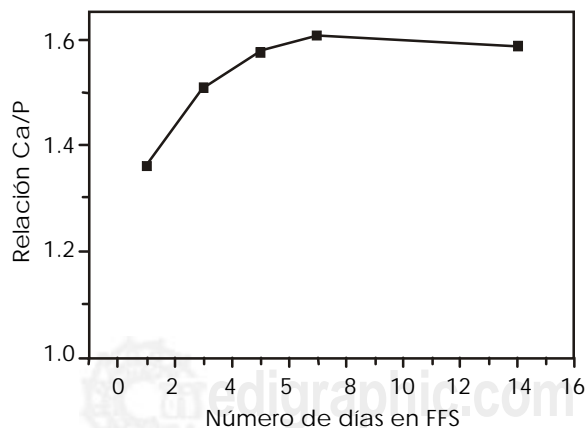


Figura 3. Gráfica de los valores de la relación Ca/P en los recubrimientos de fosfato de calcio sobre las superficies de poliuretano tratadas con TEOS.

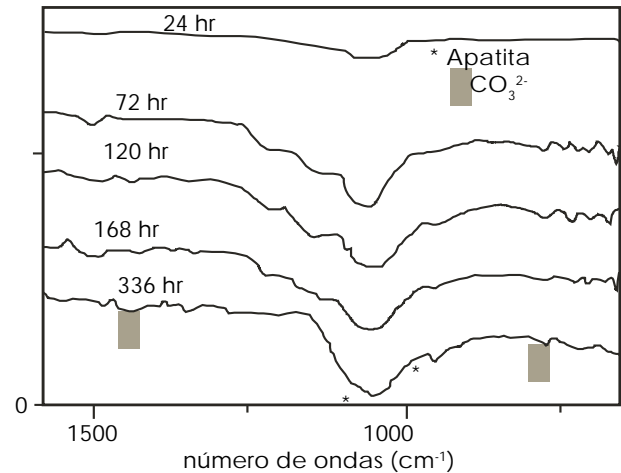


Figura 4. Espectros infrarrojos de las muestras de poliuretano tratadas con TEOS y sumergidas en FFS por diferentes periodos de tiempo.

En la figura 2 los patrones EDAX revelan la presencia de sodio y cloro, así como un poco de magnesio y potasio del FFS, mientras que los picos de silicio desaparecen conforme el tiempo de inmersión incrementa, debido a su disolución y a la capa de apatita que está siendo formada en la superficie. La formación de apatita se le atribuye a los grupos silanol (Si-OH) que son formados a partir de la silica gel depositada en la superficie del poliuretano por el tratamiento con TEOS. Los valores finales de la relación Ca/P fueron alrededor de 1.6, en la figura 3 se muestra la relación Ca/P en función del tiempo de inmersión, dados por ICP los cuales coinciden con los resultados obtenidos por EDAX. Sin embargo, en un principio los valores son de alrededor de 1.3, esta relación coincide con la fase de fosfato octacálcico, lo que hace suponer que en un principio se forma esta fase y ante la ligera saturación de iones, calcio y fosfato, esta fase pudiera actuar como precursora para formar la hidroxiapatita carbonatada. Los valores finales coinciden con los de la hidroxiapatita carbonatada, lo que se corrobora con los espectros infrarrojos.

Los espectros infrarrojos de las muestras inmersas en la solución por diferentes periodos de tiempo se muestran en el figura 4, donde se aprecian los picos correspondientes al PO₄ a 1060 y 952 cm⁻¹ los cuales emergen progresivamente como picos principales y predominantes conforme el tiempo de inmersión aumenta. El pico a 1460 cm⁻¹ se debe al alargamiento del C-O que se debe a la sustitución de iones de carbonato en la estructura de la apatita, por lo tanto se pue-

de afirmar que el recubrimiento es apatita carbonatada; estos resultados coinciden con los obtenidos por autores, que aunque con diferentes técnicas han recubierto diferentes materiales con apatita por medios biomiméticos.^{14,15}

Un gran número de vidrios de sílica se han caracterizado por el crecimiento de hidroxiapatita en sus superficies cuando son inmersas en un fluido fisiológico simulado. Se ha determinado que la causa del crecimiento de una capa de fosfato de calcio es debido a los grupos silanol.¹⁵ En este trabajo los grupos silanol fueron agregados en la superficie de los poliuretanos por el tratamiento de éste con un alcoholóxido de silicio, el tetra etilortosilicato (TEOS). Durante la inmersión en un fluido fisiológico simulado, se observó la formación de núcleos de fosfato de calcio del tipo esférico los cuales comenzaron a crecer para recubrir la superficie entera. La fase del recubrimiento de fosfato de calcio en la superficie del polímero es identificada como apatita carbonatada. En los PU se detectó algo de sodio y cloro del FFS, también se detectó magnesio; estos elementos y especialmente el magnesio se podrían incorporar a la estructura de la apatita y reemplazar el calcio. Varios autores han reportado que la formación de una capa de Ca-P en la superficie de un material en un fluido fisiológico simulado es un indicador de su bioactividad, ya que los materiales bioactivos se unen al hueso in vivo a través de un recubrimiento similar en sus superficies.^{16,17} Este es un método sencillo en el cual se puede funcionalizar superficies no bioactivas en bioactivas o bien aumentar la bioactividad de los materiales bioactivos tan solo por el tratamiento con TEOS y su biomineralización en un FFS.

Las propiedades favorables de la calcificación en los poliuretanos pueden ser explicada en términos de los grupos SiOH en la superficie del poliuretano.

De acuerdo a nuestros experimentos y a lo reportado por otros autores^{18,19} el mecanismo de formación de la apatita es el siguiente: El tratamiento con HCl incrementa los grupos polares en la superficie del poliuretano, consecuentemente, incrementa su afinidad a los iones silicatos, éstos proveen de sitios específicos para la nucleación de apatita, estos iones los SiOH son capaces de unirse simultáneamente a los iones calcio y fosfato, lo que conlleva a una acumulación de los iones en la vecindad de la superficie, induciendo la formación de apatita. Como resultado, un gran número de núcleos de apatita se forman rápida-

mente en la superficie del polímero durante la etapa de incubación en FFS, una capa de fosfato de calcio se forma primero la cual tiene una relación de Ca/P menor a 1.5. Después hay una nucleación y crecimiento de una capa secundaria por el consumo de los iones de calcio y fosfato del medio. La capa inicial tiene una relación Ca/P comparable a la fase del fosfato octacálcico (OCP) y la cual aparentemente actúa como un precursor de la fase secundaria, como el tiempo de inmersión incrementa, la relación Ca/P incrementa hasta aproximadamente 1.6, correspondiente a la apatita biológica.

CONCLUSIONES

Se logró la formación de una capa de apatita carbonatada sobre la superficie de un poliuretano, por la funcionalización de su superficie. Se cree que la adhesión de los grupos silanol en la superficie del polímero es la causa de que el material sea susceptible a la formación de hidroxiapatita carbonatada similar a la del hueso. Este proceso puede ser una ruta apropiada como tratamiento de pre-implantación para formar recubrimientos bioactivos sobre la superficie de materiales poliméricos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Okazaki M, Takashi J. *Biomaterials* 1999; 20: 1073.
2. Rabalais ML, Raymond AY, Elizabeth TM. *Periodontol J* 1981; 52: 680.
3. Cabrini M, Cigada A, Rondelli G, Vicentini B. *Biomaterials* 1997; 18: 783.
4. Heikkilä JT, Aho AJ, Kangasniemi I, Yli-Urpo A. *Biomaterials* 1996; 17: 1755.
5. Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 1982; 60: 260.
6. Hench LL. *J Am Ceramic Soc* 1991; 74: 1487.
7. Kokubo T. *J Ceramic Soc Japan* 1991; 99: 965.
8. Kokubo T. *Biomaterials* 1991; 12: 155.
9. Weiner S, Addadi L. *J Mater Chem* 1997; 7: 689.
10. Stupp S, Braun PV. *Science* 1997; 277: 1242.
11. Hench LL, Wilson J. Editors. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World Scientific, 1993.
12. Miyaji F, Kim HM, Handa S, Kokubo T, Nakamura T. *Biomaterials* 1999; 20: 913.
13. Marcolong M, Ducheyne P, Lacourse WL. *J Biomed Mater Res* 1997; 31: 442.
14. Santos JD, Jha LJ, Monteiro FJ. *J Mater Sc: Mater Med* 1996; 7: 181.
15. Tanahashi M, Yao T, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T, Yamamuro T. *J Amer Ceram Soc* 1994; 77: 2805.
16. Neo M, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kokubo T, Bando Y. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1419.
17. Neo M, Kotani S, Fujita Y, Yamamuro T, Bando Y, Ohtsuki C, Kokubo T. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 452.
18. Reis RL, Cunha AM, Fernandes MH, Correia RN. *J Mater Sc: Mater Med* 1997; 8: 897.
19. Tanahashi M, Yao T, Kokubo T, Miyamoto T, Minnoda M, Nakamura T, Yamamuro T. *J Mater Sc: Mater Med* 1995; 6: 319.